



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DOCTORADO EN MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR

**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA SUBUNIDAD ALFA DEL
RECEPTOR DE LA INTERLEUCINA 5 COMO POSIBLE
BIOMARCADOR FARMACOGENÉTICO EN EL ASMA**

TESiS DOCTORAL

Sandra Elena Pérez

Salamanca

2022



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA SUBUNIDAD ALFA DEL
RECEPTOR DE LA INTERLEUCINA 5 COMO POSIBLE
BIOMARCADOR FARMACOGENÉTICO EN EL ASMA**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

Sandra Elena Pérez

para la obtención del grado de Doctora por la Universidad de Salamanca

Directores

Dra. Dña. Catalina Sofía Sanz Lozano

Dr. D. Ignacio Jesús Dávila González

Dra. Dña. María Asunción García Sánchez

2022

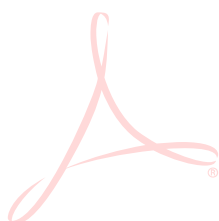
La Dra. Dña. Catalina Sofía Sanz Lozano, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética, el Dr. D. Ignacio Jesús Dávila González, Catedrático del Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, y la Dra. Dña. María Asunción García Sánchez, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Análisis molecular de la subunidad alfa del receptor de la interleucina 5 como posible biomarcador farmacogenético en el asma”, ha sido realizada por la graduada en Biotecnología Dña. Sandra Elena Pérez bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética, dentro del programa de doctorado en Microbiología y Genética Molecular de la Universidad de Salamanca.

Que, a nuestro juicio, reúne los requisitos científicos y formales suficientes para ser presentada ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

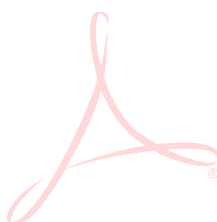
Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca a 24 de junio de 2022.



Fdo: Dra. Dña. Catalina S. Sanz Lozano



Fdo: Dr. D. Ignacio J. Dávila González



Fdo: Dra. Dña. María Asunción García Sánchez

*A mi abuela,
mi trozo de cielo*

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que me han acompañado y apoyado durante los años de realización de este trabajo.

En primer lugar, a mis directores de Tesis por darme esta oportunidad y enseñarme cómo trabaja un buen equipo. A Ignacio Dávila, por su profesionalidad y su tiempo, por confiar en que este trabajo saldría adelante; a Asunción García, por su cercanía, por enseñarme a trabajar y acompañarme en mis inicios en el laboratorio; y a Catalina Sanz, por su implicación y sus palabras de ánimo, por orientarme y estar siempre disponible para resolver mis dudas incluso en la distancia. También a María Isidoro, por creer en mí desde el primer día, por tener siempre el consejo adecuado para darme y enseñarme tanto a nivel profesional y personal.

A todo el Servicio de Alergología, por su comprensión y colaboración. A Miguel y Chus, por asesorarme, por sus consejos y su experiencia.

A todas las personas que forman parte del Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica, que me han enseñado a trabajar y con las que he compartido y disfrutado los cuatro años de residencia. A Belén y Carlos, por estar disponibles en todo momento. A mis resis mayores y pequeños, especialmente a Cristina, David, Alba y Sergio, por su amistad, por ponerle siempre un toque de humor a la vida y porque sin ellos la residencia no hubiese sido igual. David, este trabajo es tan tuyo como mío, gracias por ser el mejor compañero de residencia y tesis que he podido tener.

A mis compañeras del Hospital de Laredo, por la comprensión y el apoyo moral que me han dado en estas últimas semanas de la recta final.

A mis padres y mi hermana, por su amor incondicional, por confiar en mí y apoyarme siempre en todo lo que me he propuesto. A todos mis familiares y amigos, por animarme en esta etapa. A Alicia y Alba, gracias por ser mi hogar durante estos años, por saber escuchar y compartir día tras día alegrías, agobios y hasta una cuarentena.

A Manuel, gracias por ser tú, por enseñarme a ver siempre el lado positivo y encontrar una solución para todo, por hacer la distancia más fácil, por tu alegría y tu paciencia, por estar siempre a mi lado y haber terminado juntos otra etapa más.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	19
ÍNDICE DE TABLAS	23
1. INTRODUCCIÓN	27
1.1. ASMA.....	27
1.1.1. Definición	27
1.1.2. Epidemiología.....	28
1.1.3. Etiología.....	29
1.1.4. Patogenia.....	34
1.1.5. Diagnóstico.....	41
1.1.6. Clasificación.....	45
1.1.7. Tratamiento.....	51
1.2. GENÉTICA DEL ASMA	55
1.2.1. Estudios genéticos.....	56
1.2.2. Genes asociados con el asma.....	58
1.2.3. Farmacogenética en el asma.....	60
1.3. IL-5RA Y SU IMPLICACIÓN EN EL ASMA	63
1.3.1. Interleucina 5	63
1.3.2. Receptor de la interleucina 5	64
1.3.3. Asociación con el asma	67
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	71
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	75
3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO.....	75

3.2.1. Estudio transcriptómico	76
3.2.2. Estudio de validación	76
3.2.3. Estudio farmacogenético	76
3.3. VARIABLES.....	77
3.3.1. Datos demográficos	77
3.3.2. Asma.....	79
3.3.3. Atopia	80
3.3.4. Poliposis nasosinusal.....	81
3.3.5. Parámetros clínicos	82
3.4. ANÁLISIS MOLECULAR	88
3.4.1. Análisis transcriptómico.....	88
3.4.2. Análisis de expresión génica	92
3.4.3. Análisis farmacogenético	99
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	100
3.5.1. Análisis descriptivo.....	100
3.5.2. Análisis bivariante y multivariante.....	100
3.5.3. Análisis de correlación	101
3.5.4. Análisis de sensibilidad y especificidad mediante curvas ROC	101
4. RESULTADOS	105
4.1. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO	105
4.1.1. Características de la población a estudio.....	105
4.1.2. Análisis de expresión diferencial.....	108
4.1.3. Análisis de enriquecimiento ontológico.....	113
4.1.4. <i>IL5RA</i> en el estudio transcriptómico	117
4.2. ESTUDIO DE VALIDACIÓN	118
4.2.1. Características de la población a estudio.....	118

4.2.2. Estudio de asociación de las variables clínicas con el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de <i>IL5RA</i>	126
4.2.3. Estudio de correlación entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de <i>IL5RA</i>	139
4.2.4. Aplicación clínica de <i>IL5RA</i> mediante el análisis de curvas ROC.....	146
4.3. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO.....	149
4.3.1. Características de la población a estudio.....	149
4.3.2. Tratamiento con benralizumab.....	152
5. DISCUSIÓN.....	163
5.1. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO	164
5.1.1. Características de la población a estudio.....	164
5.1.2. Análisis transcriptómico	165
5.2. ESTUDIO DE VALIDACIÓN	169
5.2.1. Características de la población a estudio.....	169
5.2.2. Estudio de asociación de las variables clínicas con el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de <i>IL5RA</i>	172
5.2.3. Estudio de correlación entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de <i>IL5RA</i>	174
5.2.4. <i>IL5RA</i> y su aplicación clínica en el asma.....	177
5.3. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO.....	179
5.3.1. Características de la población a estudio.....	179
5.3.2. Tratamiento con benralizumab.....	180
6. CONCLUSIONES	187
7. BIBLIOGRAFÍA.....	191
ANEXO.....	209

ABREVIATURAS

AA: asma alérgica

ACT: test de control del asma

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: ácido desoxirribonucleasa

ADNc: ADN complementario

AINE: antiinflamatorios no esteroideos

ANA: asma no alérgica

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ácido ribonucleasa

ARNm: ARN mensajero

AVAD: años de vida ajustados por discapacidad

ATS: *American Thoracic Society*

AUC: área bajo la curva

BCGFII: factor II de crecimiento de células B

CAUSA: Complejo Asistencial Universitario de Salamanca

CEIm: Comité de Ética de la Investigación con medicamentos

Ct: *Threshold Cycle*

DAVID: *The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*

DE: desviación estándar

EAACI: *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology*

ECP: proteína catiónica eosinofílica

EDF: factor de diferenciación eosinofílica

EDN: neurotoxina derivada del eosinófilo

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EPO: peroxidasa eosinofílica

EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por los antiinflamatorios no esteroideos

ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares

ERS: *European Respiratory Society*

FcεRI: receptores de alta afinidad para IgE

FDR: *false discovery rate*

FeNO: fracción exhalada de óxido nítrico

FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo

FVC: capacidad vital forzada

GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GBD: *Global Burden of Disease*

GCO: glucocorticoides orales

GEMA: Guía Española para el Manejo del Asma

GEPA: granulomatosis eosinofílica con poliangéitís

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GO: *Gene Ontology*

GWAS: *Genome Wide Association Studies*

hAINE: hipersensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos

IBSAL: Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca

IC: intervalo de confianza

IFN: interferón

IL: interleucina

IL-R: receptor de la interleucina

IL-5RA: subunidad alfa del receptor de la interleucina 5

ILC2: células linfoides innatas de tipo 2

Ig: inmunoglobulina

JAK: proteínas quinasas Janus

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MBP: proteína mayor básica

MS: monosensibilizado

MIQE: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

MMP: metaloproteinasas de la matriz

NaCl: cloruro de sodio

NGS: *Next Generation Sequencing*

NK: linfocitos citolíticos naturales o *natural killer*

NO: óxido nítrico

PC (+): pruebas cutáneas positivas

PC₂₀metacolina: concentración de metacolina que provoca una reducción del FEV₁ del 20 %

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PEF: flujo espiratorio máximo

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PN: poliposis nasosinusal

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa

RI: rango intercuartílico

RIN: *RNA Integrity Number*

RNA-seq: secuenciación del ARNm

ROC: *Receiver Operating Characteristic*

SNP: polimorfismo de nucleótido único o *Single Nucleotide Polymorphism*

TAC: tomografía axial computarizada

TBP: *TATA-box binding protein*

TGF: factor de crecimiento transformante

Th: linfocitos T colaboradores

Tm: *melting temperature*

TNF: factor de necrosis tumoral

Treg: linfocitos T reguladores

TRF: factor de reemplazo de células T

TSLP: linfopoyetina del estroma tímico

VCAM-1: moléculas de adhesión celular vasculares

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VLA-4: *very late antigen-4*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa mundial de la prevalencia del asma.....	28
Figura 2. Papel de los diferentes tipos de linfocitos T en la respuesta inflamatoria presente en el asma alérgica	35
Figura 3. Características celulares de los eosinófilos	38
Figura 4. Papel de las ILC2 en la respuesta inflamatoria presente en el asma.....	39
Figura 5. A) Curva volumen-tiempo. B) Curva flujo-volumen	43
Figura 6. Fenotipos del asma según el patrón inflamatorio T2 y no T2.....	48
Figura 7. Mecanismos de acción de los glucocorticoides en el asma	52
Figura 8. Terapias biológicas basadas en anticuerpos monoclonales dirigidas contra la interleucina 5 y su receptor.....	55
Figura 9. Representación de los genes asociados con la fisiopatología del asma	59
Figura 10. Genes asociados con el asma en al menos un estudio	60
Figura 11. Enfoque terapéutico de la medicina de precisión.	62
Figura 12. Vías de señalización activadas y procesos biológicos implicados debido a la interacción de la interleucina 5 con el receptor IL-5R	66
Figura 13. Variables recogidas en el formulario del Servicio de Alergia del CAUSA.....	78
Figura 14. Enzimoimmunoanálisis para la determinación de IgE total.....	83
Figura 15. Cuestionario realizado a los pacientes en el ACT.....	87
Figura 16. Ejemplo de gráfica obtenida en el análisis de calidad del ARN mediante el equipo Agilent 2100 Bioanalyzed	90
Figura 17. Ejemplo de gráfica obtenida en la cuantificación y análisis de calidad del ARN mediante el equipo Nanodrop™ ND-1000	95
Figura 18. Curva estándar del estudio de eficiencia de los cebadores de <i>GAPDH</i>	98
Figura 19. Distribución por edades del grupo de controles y del grupo de pacientes en el estudio transcriptómico	106

Figura 20. Distribución de los pacientes según la gravedad del asma en el estudio transcriptómico	107
Figura 21. Antecedentes familiares de asma y atopia en pacientes diagnosticados de asma en el estudio transcriptómico	107
Figura 22. Tratamiento con glucocorticoides inhalados e inmunoterapia específica con alérgenos en pacientes diagnosticados de asma en el estudio transcriptómico.....	108
Figura 23. Volcano plot del análisis de expresión diferencial entre el grupo de controles y el grupo de pacientes con asma alérgica.....	109
Figura 24. Mapa colorimétrico de los 44 transcritos codificantes con expresión diferencial en el grupo de controles y el grupo de pacientes con asma alérgica	112
Figura 25. Red de interacciones proteicas entre las proteínas codificadas por los transcritos con expresión diferencial en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles.....	116
Figura 26. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> del grupo de controles y el grupo de pacientes con asma alérgica en el estudio transcriptómico	117
Figura 27. Distribución por edades del grupo de controles y del grupo de pacientes en el estudio de validación.....	119
Figura 28. Distribución de los pacientes asmáticos según la clasificación del asma por la presencia de atopia y/o poliposis nasosinusal en el estudio de validación	121
Figura 29. Distribución de los pacientes según edad de inicio del asma	121
Figura 30. Distribución de los pacientes asmáticos según la ausencia o presencia de eosinofilia	122
Figura 31. Distribución de los pacientes según la gravedad del asma en el estudio de validación.....	122
Figura 32. Distribución de los pacientes según la sensibilización alérgica y los aeroalérgenos en monosensibilizados en el estudio de validación	123

Figura 33. Antecedentes familiares de asma y atopia en pacientes diagnosticados de asma en el estudio de validación	124
Figura 34. Hipersensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos respiratoria y cutánea en pacientes diagnosticados de asma en el estudio de validación.....	125
Figura 35. Presencia de enfermedad respiratoria exacerbada por los antiinflamatorios no esteroideos con alergia y sin alergia en los pacientes diagnosticados de asma en el estudio de validación.....	125
Figura 36. Tratamiento con glucocorticoides inhalados e inmunoterapia específica con alérgenos en pacientes diagnosticados de asma en el estudio de validación	126
Figura 37. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según la presencia de atopia y/o poliposis nasosinusal en los pacientes asmáticos.....	129
Figura 38. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según inicio del asma en los pacientes respecto a los controles	131
Figura 39. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según ausencia o presencia de eosinofilia en los pacientes asmáticos.....	133
Figura 40. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según gravedad del asma.....	135
Figura 41. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> del grupo de controles y el grupo de pacientes asmáticos en el estudio de validación	142
Figura 42. Niveles de expresión de <i>IL5RA</i> en los cuartiles del recuento de eosinófilos de la población en el estudio de validación	142
Figura 43. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> de los pacientes con asma no alérgica y asma alérgica en el estudio de validación.....	144
Figura 44. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> de los pacientes con asma en ausencia o presencia de poliposis nasosinusal en el estudio de validación	145

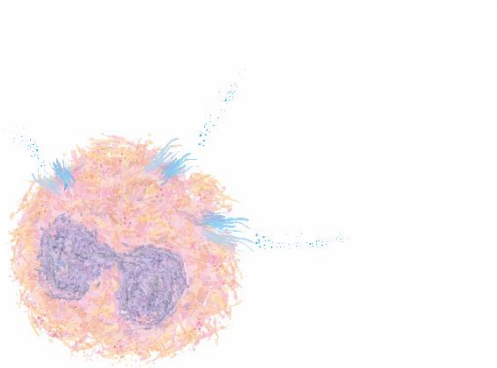
Figura 45. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> en función de la gravedad del asma en el estudio de validación.....	146
Figura 46. Representación de la curva ROC para los niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> , el recuento de eosinófilos y la combinación de ambas variables en los pacientes asmáticos respecto a los controles	147
Figura 47. Distribución de los pacientes según la clasificación del asma por atopía y/o poliposis nasosinusal	150
Figura 48. Distribución de los pacientes según la sensibilización alérgica y los aeroalérgenos en monosensibilizados en el estudio farmacogenético	151
Figura 49. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> en el pretratamiento y después del tratamiento con benralizumab.....	155
Figura 50. Correlación entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> en el pretratamiento y después del tratamiento con benralizumab.....	156
Figura 51. Porcentaje de mejoría del FEV ₁ después del tratamiento con benralizumab en cada paciente.....	157
Figura 52. Correlación entre el porcentaje de mejoría del FEV ₁ después del tratamiento con benralizumab y los niveles basales de expresión relativa de <i>IL5RA</i>	157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los fenotipos del asma en categorías	45
Tabla 2. Programa de amplificación SYBR Green I 96-II utilizado en la qPCR.....	96
Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para la qPCR	97
Tabla 4. Características de la población en el estudio transcriptómico	105
Tabla 5. Listado de los 21 transcritos codificantes con expresión diferencial que se encontraron sobreexpresados en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles	110
Tabla 6. Listado de los 23 transcritos codificantes con expresión diferencial que se encuentran infraexpresados en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles	111
Tabla 7. Análisis de enriquecimiento ontológico de procesos biológicos de los transcritos codificantes con expresión diferencial en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles.....	114
Tabla 8. Características de la población en el estudio de validación.....	118
Tabla 9. Características de los grupos de pacientes asmáticos estudiados.....	120
Tabla 10. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> en pacientes asmáticos respecto a los controles	127
Tabla 11. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según la presencia de atopia y/o poliposis nasosinusal en los pacientes asmáticos respecto a los controles.....	128
Tabla 12. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según inicio del asma en los pacientes respecto a los controles	130
Tabla 13. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según la presencia de eosinofilia en los pacientes asmáticos respecto a los controles	132
Tabla 14. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según gravedad del asma respecto a los controles	134

Tabla 15. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según la sensibilización alérgica en los pacientes asmáticos respecto a los controles.....	137
Tabla 16. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según la hipersensibilidad a los AINE en los pacientes asmáticos respecto a los controles.....	138
Tabla 17. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según presencia de EREA en los pacientes asmáticos respecto a los controles.....	138
Tabla 18. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> según tratamiento con glucocorticoides inhalados o inmunoterapia específica con alérgenos respecto a los pacientes sin tratamiento	139
Tabla 19. Coeficientes de correlación de Spearman entre el recuento de eosinófilos, basófilos y neutrófilos con los niveles de expresión de <i>IL5RA</i> en el grupo de controles y los diferentes grupos de pacientes	141
Tabla 20. Distribución en los cuatro cuadrantes del grupo de controles y los diferentes grupos de pacientes	144
Tabla 21. Análisis de la curva ROC para los niveles de expresión relativa de <i>IL5RA</i> , el recuento de eosinófilos y la combinación de ambas variables en los grupos de pacientes asmáticos respecto a los controles	148
Tabla 22. Características de la población en el estudio farmacogenético.....	149
Tabla 23. Características clínicas de cada paciente asmático en el estudio farmacogenético.....	150
Tabla 24. Recuento de eosinófilos, niveles de expresión de <i>IL5RA</i> y parámetros clínicos de cada paciente en el pretratamiento y postratamiento con benralizumab.....	153
Tabla 25. Puntuación obtenida por cada paciente para evaluar su respuesta a benralizumab según el estudio Delphi y el índice FEOS.....	159

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASMA

1.1.1. Definición

El término asma proviene del latín *asthma*, que deriva del griego ἄσθμα y significa “jadeo, sofoco respiratorio”. Se conocen referencias históricas en las diferentes culturas, percibiendo cómo el concepto de asma ha ido evolucionando con el tiempo. Las primeras evidencias se atribuyen a Homero (s. VIII a.C.) y más tarde, en la medicina hipocrática, se utilizaba para describir un episodio agudo de falta de aire, considerándose más bien como un síntoma y no como una enfermedad. Se cree que fue Galeno (s.II d.C.) el que la define por primera vez como una enfermedad caracterizada por dificultad respiratoria (1).

Hoy en día, se considera que el asma no es una única entidad, sino un síndrome heterogéneo que puede presentar diversos fenotipos con manifestaciones clínicas similares, pero de etiologías probablemente diferentes (2), resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Sus principales síntomas respiratorios son tos, sibilancias, disnea y opresión torácica, que varían entre los pacientes y a lo largo del tiempo (3).

Debido a su complejidad, no existe una definición precisa de asma, pero en la actualidad se han elaborado guías y documentos de consenso que reúnen los conceptos clave que la caracterizan. La Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA) la define como “una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, donde participan distintas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos, que cursa con hiperrespuesta bronquial y una obstrucción variable al flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción medicamentosa o espontáneamente” (2).

1.1.2. Epidemiología

El asma es la enfermedad respiratoria crónica con mayor prevalencia en el mundo, afectando a más de 300 millones de personas de todas las edades, según los datos actualizados en el estudio epidemiológico *Global Burden of Disease* (GBD) (4). Esta enfermedad está presente en todos los países, pero su distribución no es homogénea y la prevalencia oscila entre el 0,2-21 % en las distintas zonas geográficas (5), hallándose las cifras más bajas en Asia, México o el este de Europa y las cifras más altas en Australia, Brasil o el norte de Europa (Figura 1). En España se estima que la prevalencia del asma en la población se sitúa entre el 3-7 %, aunque también existe variabilidad en función de la localización geográfica. Por lo general, la prevalencia es mayor en las zonas de costa y en las islas respecto a las zonas de interior (6,7).

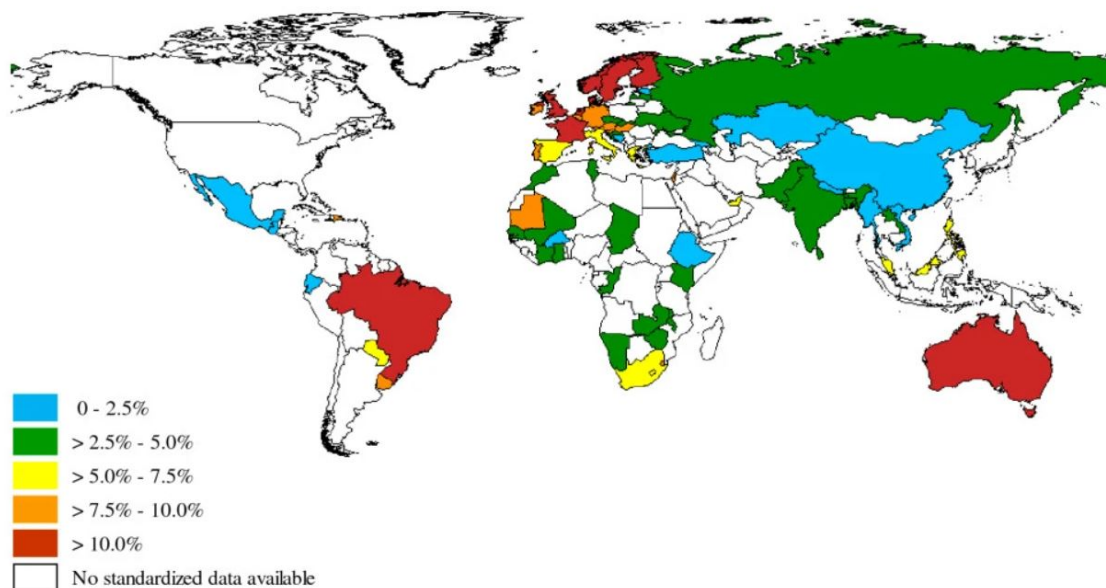


Figura 1. Mapa mundial de la prevalencia del asma. Tomada de (5).

Hay que destacar que la prevalencia del asma ha sufrido un aumento progresivo en las últimas dos décadas, posiblemente en relación con cambios ambientales y con el estilo de vida, sobre todo en países occidentales y en creciente industrialización. Este aumento afecta principalmente a personas de mediana edad y a mujeres, y puede explicarse debido al incremento del asma alérgica y la estabilización del asma no alérgica (8). Debido a la previsión del aumento de la población urbana a un 45-59 % para

el año 2025, se estima que el número de personas con asma podría incrementarse a 400 millones (9).

El asma supone un importante problema sociosanitario y económico con un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes. En 2019, la carga de enfermedad por asma a nivel mundial supuso la pérdida de 21 millones de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) (4). En cuanto a la carga económica, los costes directos se relacionan con el consumo de recursos sanitarios, incluyendo los gastos de hospitalización, las pruebas diagnósticas y los tratamientos farmacológicos, mientras que los costes indirectos se relacionan principalmente con el absentismo laboral (10). En España, el coste anual medio por paciente asmático es de 1533 euros y aumenta en función de la gravedad, estimándose un coste anual global para el Sistema Nacional de Salud de 1480 millones de euros, según el estudio AsmaCost (11). Además, el 70 % de los pacientes presenta un inadecuado control de la enfermedad, lo que implica un incremento añadido en el coste asociado al asma (12).

En la actualidad, la mortalidad asociada al asma a nivel mundial es inferior al 1 %, registrándose más de 400 000 muertes anuales según los datos reflejados en GBD 2019 (4). En cuanto a las tasas de mortalidad, se observan diferencias geográficas importantes relacionadas con la accesibilidad a medicamentos para el control de la enfermedad en los diferentes países (9). En este sentido, se ha demostrado que los programas de mejora del control del asma han conseguido reducir la mortalidad asociada en aquellos países en los que han sido implantados (10). En España se registraron 993 fallecimientos por asma en el año 2019, según el Instituto Nacional de Estadística (13).

1.1.3. Etiología

Por el momento, se desconocen las causas responsables de la enfermedad asmática. La susceptibilidad individual a presentar la enfermedad es el resultado de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales. En este sentido, es importante diferenciar entre factores de riesgo para el desarrollo del asma y factores que desencadenan los síntomas característicos de la enfermedad.

a) Factores de riesgo

Los factores relacionados con la aparición del asma que presentan un mayor grado de asociación son los factores propios del huésped, como el sexo, la obesidad, la atopia, la rinitis o el componente genético, y los factores perinatales, como la prematuridad o la exposición al tabaco durante la gestación. También existen factores ambientales, que son muy variables y pueden intervenir en cualquier edad, como los aeroalérgenos, las infecciones respiratorias y el tabaquismo (2). Algunos de estos factores se detallan a continuación.

Sexo

La prevalencia del asma durante la infancia es mayor en los niños que en las niñas, pero durante la adolescencia este patrón se modifica y se vuelve similar entre ambos sexos. Sin embargo, la prevalencia del asma en adultos es superior en las mujeres que en los hombres. Este hallazgo podría estar relacionado con las diferencias existentes en la estructura anatómica de las vías respiratorias entre ambos sexos y, probablemente, también con el papel que juegan las hormonas sexuales, como los estrógenos, en la respuesta inflamatoria (14).

Obesidad

La obesidad se ha asociado con la enfermedad asmática, aunque el mecanismo que relaciona ambos procesos es complejo. Se ha sugerido que ciertas moléculas mediadoras que se encuentran elevadas en la obesidad podrían afectar a las vías respiratorias y aumentar la probabilidad de desarrollar asma. Entre ellas destaca la leptina, que además presenta homología estructural con citocinas como la IL-6 (15).

Atopia

Hoy en día se considera que la atopia es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo del asma (16), relacionándose con la predisposición de base genética a desarrollar una respuesta mediada por anticuerpos IgE frente a antígenos ambientales. Las principales enfermedades atópicas son la alergia alimentaria, la dermatitis atópica, el asma alérgica y la rinoconjuntivitis alérgica (17). Asimismo, se denomina marcha

atópica a la sucesión de varias de estas enfermedades de manera cronológica en la edad pediátrica, desde la dermatitis atópica o la alergia alimentaria en lactantes hasta el asma alérgica en niños más mayores. De esta manera, se podría hacer seguimiento e identificar precozmente a niños que podrían desarrollar asma (18).

Rinitis

La rinitis se caracteriza por ser un proceso inflamatorio de la mucosa nasal que puede afectar también a los senos paranasales, denominándose rinosinusitis. Múltiples estudios han demostrado la asociación entre rinitis y asma, indicando que la prevalencia del asma en pacientes con rinitis es más elevada que en la población general (19,20). Tanto la rinitis alérgica como la no alérgica suponen un factor de riesgo para el desarrollo del asma. Además, existe una relación temporal entre ambas patologías, precediendo generalmente la rinitis al desarrollo del asma (21,22).

La poliposis nasosinusal es un subtipo de rinosinusitis crónica en la que se observa la formación de pólipos que cubren las fosas nasales. La presencia de poliposis nasosinusal supone un factor de riesgo para el desarrollo del asma y se asocia también con una mayor gravedad y peor control de la enfermedad (23,24). Aquellos pacientes que presentan conjuntamente poliposis nasosinusal, asma grave e hipersensibilidad a la aspirina y a otros antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se caracterizan por una condición clínica crónica más grave, denominada enfermedad respiratoria exacerbada por los AINE (EREA), tríada de Samter o enfermedad de Widal (25).

Genética

Además de contribuir al desarrollo del asma, los factores genéticos pueden modular la respuesta frente a otros factores de riesgo o intervenir sobre la acción de factores desencadenantes. Existen multitud de genes que han sido asociados a esta enfermedad, destacando la existencia de diversidad en función del grupo étnico. La complejidad del componente hereditario del asma se detallará más adelante.

Factores maternos

Durante la gestación se genera un ambiente inmunológico protector para el feto, protegiéndolo del rechazo mediante la acción de citocinas de linfocitos T colaboradores de tipo 2 (Th2) y de linfocitos T reguladores (Treg), que inhiben la respuesta materna de tipo Th1. Por lo tanto, un desequilibrio acentuado hacia la producción de citocinas inhibitoras de la respuesta Th1 podría desempeñar un papel importante en la posterior aparición de alergia o asma (26). Además, durante la gestación debe evitarse la realización de actividades que puedan perjudicar el desarrollo pulmonar del feto, como fumar, una mala alimentación o el estrés.

b) Factores desencadenantes

La exposición a estos factores origina la aparición de los síntomas asmáticos y puede llegar a causar una exacerbación del asma, por lo que es importante identificarlos y evitarlos para un mejor control de la enfermedad. Entre ellos destacan principalmente factores ambientales, como los atmosféricos, los domésticos o los agentes infecciosos. No obstante, existe un solapamiento entre algunos factores ambientales considerados de riesgo para el desarrollo del asma además de ser desencadenantes de síntomas; por ejemplo, los aeroalérgenos o el tabaquismo. Asimismo, existen factores laborales como los metales o los cosméticos y factores sistémicos como los fármacos o los alimentos (2). Algunos de estos factores se detallan a continuación.

Aeroalérgenos

Uno de los factores desencadenantes más importantes en el asma es la exposición a aeroalérgenos, ya que se ha demostrado que tienen un papel relevante en el desarrollo del proceso inflamatorio (27). Se clasifican en alérgenos de interior, como los ácaros, epitelios y algunos hongos, y alérgenos de exterior, como pólenes y hongos. La importancia de éstos dependerá del grado de exposición de cada individuo en función de la zona geográfica, las condiciones de vida o la presencia de animales en el domicilio. En este sentido, los síntomas del asma pueden ser estacionales si están relacionados con alérgenos de exterior y las épocas de polinización, si bien predomina el asma con síntomas perennes debido a los alérgenos de interior (28).

Contaminación ambiental

Los estudios epidemiológicos sugieren que la contaminación ambiental empeora la función pulmonar de los pacientes y se relaciona con exacerbaciones asmáticas. Los contaminantes ambientales contribuyen a un aumento en la respuesta inflamatoria de las vías respiratorias y en la sensibilidad a los aeroalérgenos. Esto se ha observado principalmente en zonas urbanas, caracterizadas por mostrar niveles elevados de contaminantes como el dióxido de nitrógeno, el ozono y las partículas derivadas de la combustión de carburantes (29,30).

Tabaquismo

El humo del tabaco es un agente irritante que podría aumentar el riesgo de padecer enfermedades de las vías respiratorias. En cuanto a su papel como desencadenante, se ha comprobado que los pacientes asmáticos fumadores presentan síntomas más graves, mayor morbilidad y un peor control de la enfermedad que los pacientes no fumadores (31). Esto podría relacionarse con la alteración en la inflamación producida en las vías respiratorias de los fumadores asmáticos, aumentado la producción de moco y la disnea (32). Además, en algunos estudios se ha observado también una intensa disminución de la función pulmonar en estos pacientes. Por otro lado, el consumo de tabaco podría reducir la efectividad de los glucocorticoides en el tratamiento del asma (31).

Infecciones

Las infecciones víricas de las vías respiratorias, causadas principalmente por rinovirus y virus respiratorio sincitial, han sido relacionadas con la aparición del asma en las primeras etapas de la vida y con el empeoramiento del control de la enfermedad en pacientes asmáticos. También se ha relacionado el aumento de exacerbaciones asmáticas con infecciones causadas por bacterias, como *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae* (30,33). No obstante, varios estudios sugieren que la exposición a ciertos agentes infecciosos en la infancia podría tener un papel protector frente al desarrollo de sensibilizaciones alérgicas. Esto se relaciona con la “hipótesis de la higiene” defendida por algunos autores y que aún se está investigando, según la cual los hábitos

higiénicos de las sociedades occidentalizadas han provocado un aumento en la prevalencia del asma en estas zonas geográficas (34).

1.1.4. Patogenia

La presencia de inflamación en las vías respiratorias, común en los pacientes asmáticos, es un fenómeno que provoca una serie de cambios fisiopatológicos característicos de la enfermedad. El principal componente patológico del asma es la obstrucción al flujo aéreo, producida tanto por la inflamación de la pared de los bronquios como por la contracción del músculo liso a causa de la hiperreactividad bronquial. Además, la progresión de la inflamación origina una remodelación en las vías respiratorias, que en algunos casos tiene como resultado una obstrucción más o menos irreversible del flujo aéreo.

a) Inflamación de las vías respiratorias

A pesar de que el asma es una enfermedad con un amplio espectro clínico, la presencia de inflamación en las vías respiratorias es una característica patológica común en todos los pacientes, independientemente de si hay un desencadenante alérgico o no. Esta inflamación se observa de forma persistente, incluso cuando los síntomas son episódicos. Los efectos más destacados se observan en la zona intermedia del árbol bronquial, aunque afecta a toda la vía respiratoria incluyendo la mucosa nasal. Sin embargo, no se ha establecido una relación consistente entre la intensidad de la inflamación y la gravedad del asma (35).

El patrón inflamatorio característico en la mayoría de los pacientes asmáticos incluye un aumento de linfocitos Th2, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos y células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2). Estas células efectoras interactúan entre ellas y producen numerosas moléculas mediadoras de la inflamación, que causan los síntomas característicos de la enfermedad. Además, las células estructurales de las vías respiratorias, como las células epiteliales o las del músculo liso, también liberan mediadores que van a potenciar la respuesta inflamatoria (36).

Linfocitos T

Los linfocitos T son responsables de la coordinación de la respuesta inflamatoria en el asma (Figura 2), fundamentalmente a través de la liberación de citocinas por los linfocitos Th2, como las interleucinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (37). Estas citocinas son responsables del reclutamiento de eosinófilos y mastocitos en las vías respiratorias y de la inducción de la producción de IgE por las células B activadas. Concretamente, la IL-4 está implicada en la diferenciación de células Th2 y el cambio de isotipo hacia IgE, la IL-5 participa en la proliferación y supervivencia de los eosinófilos, la IL-9 interviene en la activación de mastocitos y la IL-13 se relaciona con la síntesis de IgE, la hiperreactividad bronquial y la hipersecreción de moco (38).

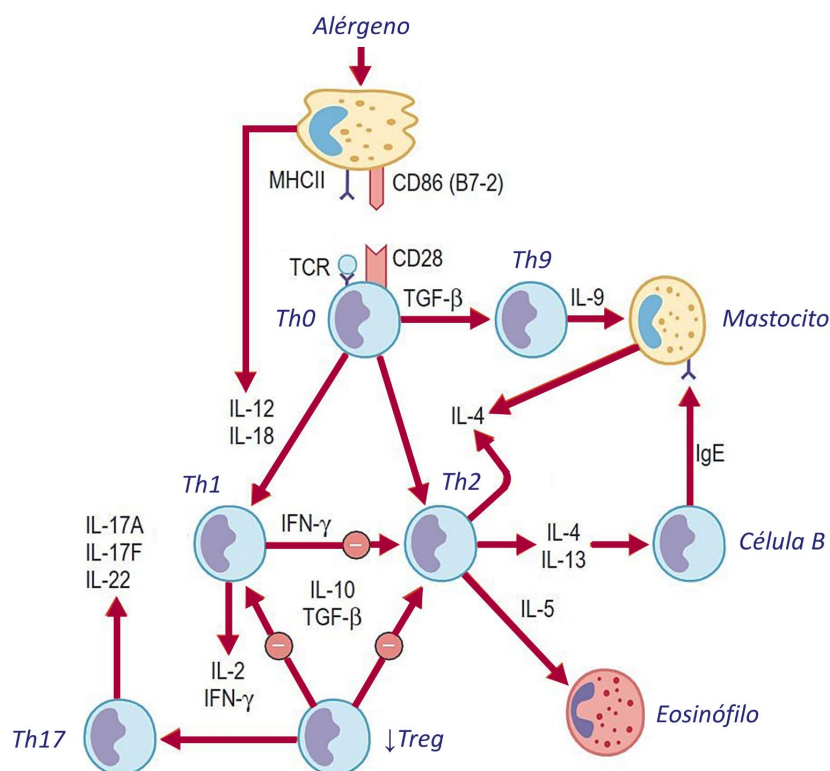


Figura 2. Papel de los diferentes tipos de linfocitos T en la respuesta inflamatoria presente en el asma alérgica. Adaptada de (38).

Cabe destacar que se ha descrito la existencia de un desequilibrio en la relación Th1/Th2, con desviación hacia la respuesta tipo T2 en pacientes asmáticos. Esto podría estar relacionado con una reducción en la actividad de los linfocitos Treg, que producen citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante

Introducción

beta (TGF- β), siendo las responsables del correcto equilibrio entre ambas respuestas (39).

Aunque las células y citocinas Th2 son las más estudiadas en la fisiopatología del asma, también intervienen en ella otros tipos celulares, como los linfocitos Th17, que producen IL-17 e IL-22 y se relacionan con un patrón de inflamación más neutrofílico, principalmente en el asma grave (40).

Células dendríticas

Son células presentadoras de antígenos que se localizan en el epitelio de las vías respiratorias. Su función es fundamental para el inicio y mantenimiento de la respuesta inducida por alérgenos, ya que van a promover la activación de los linfocitos Th. Además, son capaces de potenciar la desviación hacia la respuesta tipo T2, mediante la inhibición de la producción de IL-12 (41).

Mastocitos

Estas células desempeñan un papel esencial en la fase temprana del proceso inflamatorio, siendo responsables de iniciar la respuesta broncoconstrictora frente a los alérgenos o el resto de estímulos desencadenantes. La activación de los mastocitos se produce principalmente a través de receptores de alta afinidad para IgE (Fc ϵ RI). Tras su desgranulación, se produce la liberación de mediadores inflamatorios como prostaglandina D₂, leucotrienos e histamina, que provocan broncoconstricción, hipersecreción mucosa y aumento de la permeabilidad vascular. Además, también liberan citocinas proinflamatorias como IL-4, IL-5 e IL-13 (42).

Basófilos

A diferencia de los mastocitos, que se diferencian y maduran en los tejidos, los basófilos maduros se localizan en sangre periférica, donde constituyen menos del 1 % de los leucocitos circulantes. En procesos inflamatorios, se produce su extravasación a los tejidos, donde liberan rápidamente grandes cantidades de citocinas IL-4 e IL-13. Además, expresan en su superficie diferentes receptores para citocinas que favorecen su activación, como la IL-3, IL-5 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y

macrófagos (GM-CSF). Puesto que también poseen receptores FcεRI, tras su desgranulación, se produce la liberación de mediadores inflamatorios comunes, en parte, a los mastocitos (43).

Eosinófilos

La mayoría de los fenotipos del asma se asocian, en mayor o menor medida, con un aumento del recuento de eosinófilos, tanto en el epitelio bronquial como en la sangre periférica y la médula ósea de los pacientes. En varios estudios se ha relacionado el nivel de eosinofilia con la gravedad clínica de la enfermedad y la frecuencia de exacerbaciones (44,45).

La infiltración por eosinófilos de las vías respiratorias es una característica del asma relacionada, entre otras cosas, con la inflamación alérgica. Esta extravasación hacia los tejidos se ve favorecida por interacciones selectivas que suceden entre las moléculas de adhesión celular vasculares (VCAM-1) expresadas por el endotelio y las integrinas VLA-4 de la superficie de los eosinófilos (46). Una vez en el tejido, los eosinófilos liberan gran cantidad de mediadores que almacenan en sus gránulos citoplasmáticos (Figura 3), tales como citocinas proinflamatorias, proteínas catiónicas, quimiocinas, factores de crecimiento, radicales libres y enzimas, que promueven la hiperreactividad bronquial y la remodelación de las vías respiratorias características del asma (47).

Asimismo, los eosinófilos poseen una amplia variedad de receptores de superficie para ligandos que favorecen su activación, desgranulación, adhesión, quimiotaxis, liberación de mediadores e interacción con otros tipos celulares (Figura 3). Entre éstos se encuentran receptores de moléculas de adhesión, receptores de citocinas y factores de crecimiento, receptores de quimiocinas y receptores de mediadores lipídicos (48). Uno de los principales receptores que define la biología única del eosinófilo y su implicación en la fisiopatología del asma es el receptor de la IL-5 (IL-5R) (49), que será desarrollado en profundidad más adelante.

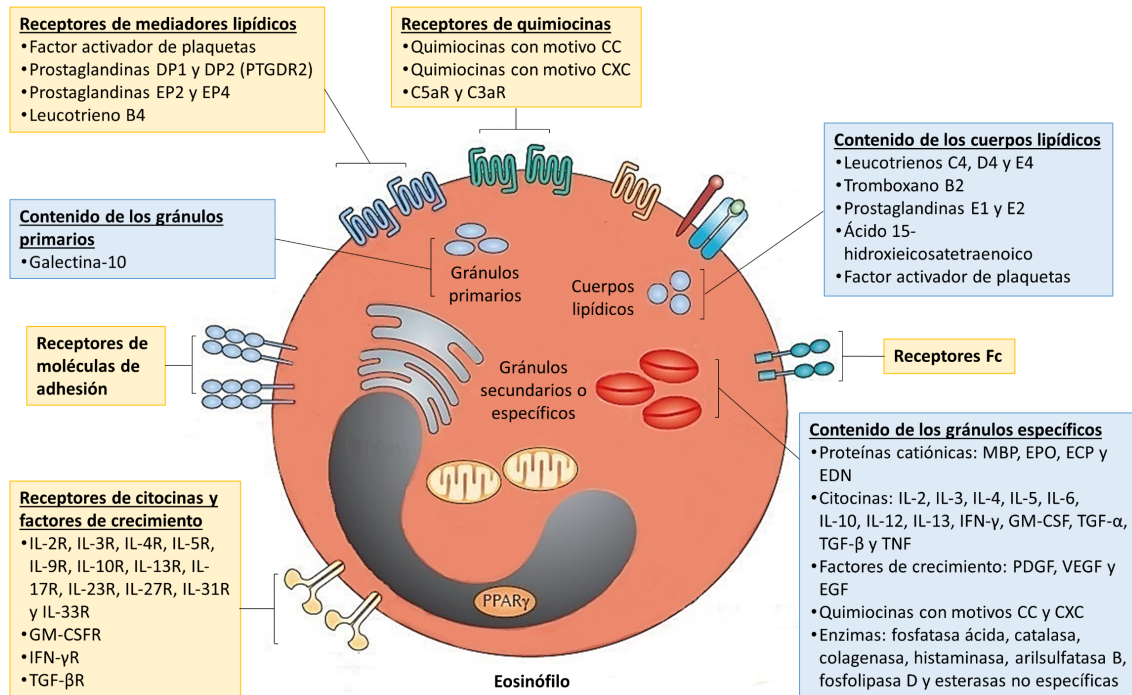


Figura 3. Características celulares de los eosinófilos. ECP: proteína catiónica eosinofílica; EDN: neurotoxina derivada del eosinófilo; EGF: factor de crecimiento epidérmico; EPO: peroxidasa eosinofílica; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IFN: interferón; IL: interleucina; MBP: proteína mayor básica; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; TGF: factor de crecimiento transformante; TNF: factor de necrosis tumoral; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. Adaptada de (49).

Neutrófilos

Los neutrófilos desempeñan un papel esencial en la inmunidad innata, siendo las primeras células circulantes que migran hacia el lugar de la inflamación (50). Este fenómeno de migración se debe al potente efecto quimioatractivo ejercido por la IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (51,52). Tras la infiltración de las vías respiratorias se produce la desgranulación de los neutrófilos y, por tanto, la liberación de mediadores que inician y amplifican la respuesta inflamatoria, además de contribuir al desarrollo de la respuesta inmunitaria adquirida. Entre estas moléculas se incluyen citocinas, defensinas, mediadores lipídicos, especies reactivas del oxígeno y proteasas, incluyendo elastasa y metaloproteinasas de la matriz (MMP), que promueven la remodelación de las vías respiratorias (51,53).

Células linfoides innatas de tipo 2

Las ILC2 se localizan en la mucosa de las vías respiratorias y juegan un papel importante en la inflamación tipo T2 en la enfermedad asmática (Figura 4). Su proliferación y actividad están reguladas por la producción de alarminas, IL-25 e IL-33, por las células del epitelio bronquial, así como por mediadores lipídicos como la prostaglandina D₂ liberada por los mastocitos. Tras su activación, tanto ante estímulos alérgicos como no alérgicos, las ILC2 secretan grandes cantidades de citocinas proinflamatorias como IL-5, IL-9 e IL-13, favoreciendo la activación de eosinófilos y mastocitos, la hiperreactividad bronquial, la remodelación y la producción de moco en las vías respiratorias (54).

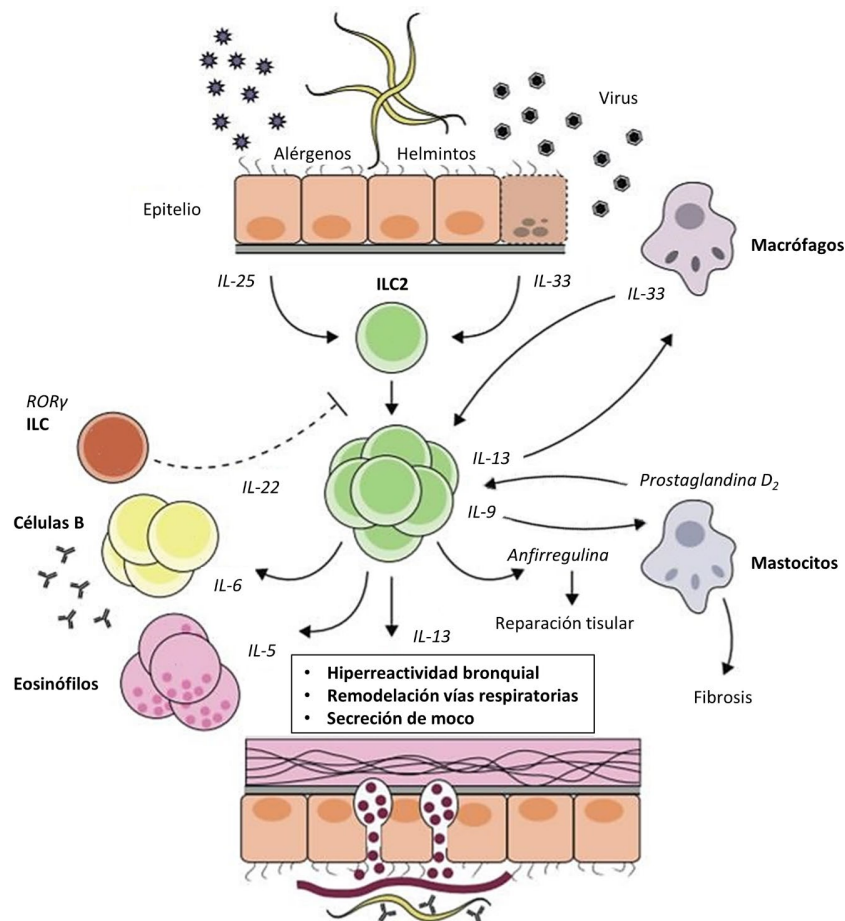


Figura 4. Papel de las ILC2 en la respuesta inflamatoria presente en el asma. Adaptada de (55).

Células epiteliales

Además de su función como barrera físicoquímica, las células estructurales de las vías respiratorias ejercen un papel importante en la fisiopatología del asma al participar activamente en el proceso inflamatorio. Así, ante la presencia de factores externos, estas células van a producir alarminas como la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), IL-25 e IL-33, que inducen el reclutamiento de células inflamatorias y el mantenimiento de la inflamación (55). También intervienen en la producción de óxido nítrico (NO) a través de la enzima óxido nítrico sintasa inducible, que es activada por la acción de citocinas proinflamatorias (56).

b) Remodelación de las vías respiratorias

Como consecuencia de la respuesta inflamatoria, los pacientes asmáticos frecuentemente presentan cambios estructurales que afectan a diferentes niveles del tejido, denominados en conjunto, remodelación de las vías respiratorias. En este proceso intervienen diferentes citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión que interaccionan con componentes de las vías respiratorias. No obstante, el proceso de remodelado puede ser secundario a una respuesta reparadora ante la inflamación crónica o aparecer independientemente al proceso inflamatorio (57).

Entre las alteraciones más comunes cabe destacar la pérdida de integridad del epitelio respiratorio debida a la apoptosis celular, la fibrosis subepitelial causada por la acumulación anormal de colágeno, la angiogénesis en el tejido bronquial, que favorece la aparición de edema, la hiperplasia e hipertrofia del músculo liso bronquial, así como la hiperplasia de las células caliciformes y la hipertrofia de las glándulas mucosas, que originan un aumento en la secreción mucosa. Todo ello conduce a una pérdida progresiva de la función pulmonar y puede desencadenar la obstrucción al flujo aéreo. Además, algunos de estos fenómenos se relacionan con la gravedad del asma (58).

c) Hiperreactividad bronquial

La hiperreactividad bronquial es una característica universal de la fisiopatología del asma, aunque no es exclusiva de esta enfermedad. Se produce debido a un aumento

de la sensibilidad de las vías respiratorias ante estímulos broncoconstrictores, que son inocuos en individuos sin asma (59). Esto conlleva al estrechamiento del calibre bronquial, la aparición de síntomas intermitentes y un aumento de la resistencia al flujo aéreo en los pacientes asmáticos.

Este fenómeno se relaciona con el proceso de inflamación y con los cambios estructurales de las vías respiratorias. Asimismo, el grado de hiperreactividad se correlaciona parcialmente con la gravedad clínica de la enfermedad y con marcadores de inflamación (60).

d) Obstrucción al flujo aéreo

Debido a los mecanismos fisiopatológicos comentados, relacionados con la inflamación de las vías respiratorias, se produce como consecuencia final la obstrucción al flujo aéreo característica del asma y responsable de la mayoría de sus síntomas. Generalmente este fenómeno es reversible, de forma espontánea o mediante tratamiento, pero en algunos pacientes con asma persistente existe un componente de obstrucción irreversible (61).

1.1.5. Diagnóstico

El diagnóstico del asma se basa fundamentalmente en aspectos clínicos y funcionales. Puesto que existen otras patologías respiratorias que pueden cursar con síntomas similares, es necesario realizar una valoración conjunta de toda la información obtenida para una mayor eficacia diagnóstica.

a) Diagnóstico clínico

El diagnóstico del asma se inicia con una sospecha clínica ante síntomas y signos característicos de la enfermedad, como sibilancias, tos, opresión torácica y disnea, que suelen presentarse de forma intermitente y con intensidad variable. Junto a la exploración física, en la anamnesis del paciente se deben recoger otros datos como el inicio de los síntomas, si el predominio es nocturno o diurno, si existe variabilidad

estacional, posibles desencadenantes o antecedentes familiares y personales de asma o atopia (62,63). Es importante tener en cuenta que una exploración física normal no descarta el diagnóstico del asma.

Debido a que ninguno de estos síntomas es patognomónico del asma (64), el diagnóstico clínico necesita apoyarse en pruebas diagnósticas, como las pruebas de función pulmonar, para demostrar objetivamente una alteración funcional correspondiente con la enfermedad.

b) Diagnóstico funcional

La espirometría es una prueba fisiológica que mide el flujo y volumen de aire en los pulmones en función del tiempo y es la prueba de primera elección para el diagnóstico del asma (2). Los parámetros espirométricos se interpretan a partir de las curvas volumen-tiempo y flujo-volumen (Figura 5), y son los siguientes:

- Capacidad vital forzada (FVC): volumen máximo de aire exhalado en una espiración forzada tras una inspiración máxima. Se expresa en ml o como porcentaje sobre los valores teóricos.
- Volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁): volumen máximo de aire exhalado en el primer segundo de una espiración forzada. Representa un flujo de aire y se expresa en ml/s o como porcentaje sobre los valores teóricos.
- Cociente FEV₁/FVC: porcentaje del volumen total de aire exhalado en el primer segundo de una espiración forzada. Se expresa en porcentaje.
- Flujo espiratorio máximo (PEF): volumen máximo de aire que puede exhalarse por segundo en una espiración forzada. Se expresa en ml/s o como porcentaje sobre los valores teóricos.

Los valores de referencia se deben adaptar a los datos antropométricos del paciente, como son la edad, el sexo, la altura y la raza.

Se considera que existe obstrucción cuando el cociente FEV_1/FVC está por debajo del límite inferior de los valores de referencia, generalmente situado en un 70%. No obstante, este límite puede generar una sobreestimación de la presencia de obstrucción en personas de edad elevada o una infraestimación en personas jóvenes (65). Una alternativa a este problema es el uso del límite inferior de la normalidad, que actualmente se está incorporando en los espirómetros (66). Además, la disminución del FEV_1 apoya la presencia de obstrucción, ayuda a establecer su gravedad e indica un riesgo mayor de exacerbaciones (67).

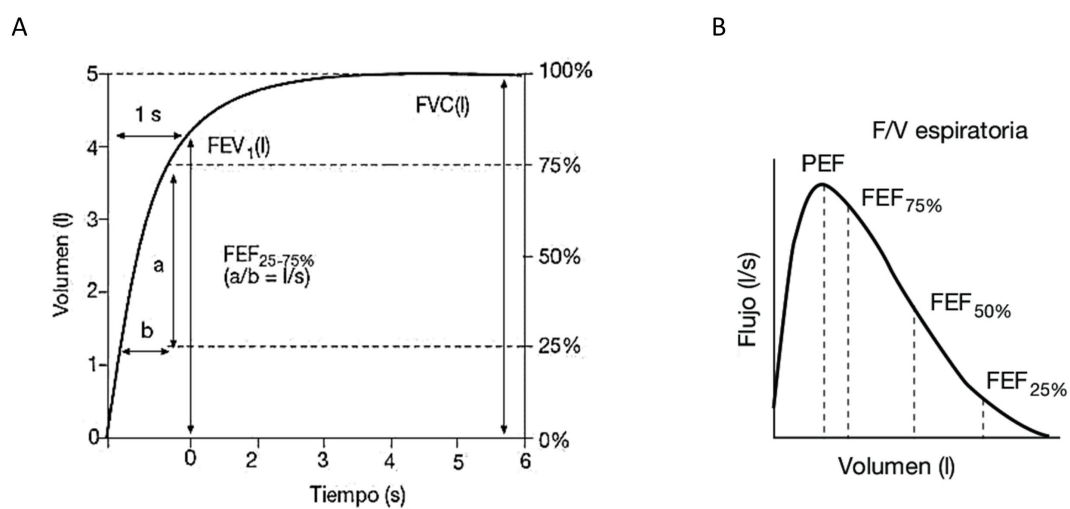


Figura 5. A) Curva volumen-tiempo. B) Curva flujo-volumen. Tomada de (66).

Ante la presencia de un patrón obstructivo será necesario realizar una prueba de broncodilatación para valorar si la obstrucción es reversible. Esta prueba consiste en medir la función pulmonar en condiciones basales y tras la aplicación de un broncodilatador. Se considera que la prueba es positiva cuando se produce una mejoría del $FEV_1 \geq 200$ ml y $\geq 12\%$ respecto al valor basal (65). La obstrucción reversible es característica del asma, pero no está presente en todos los pacientes.

La variabilidad de la función pulmonar a lo largo del tiempo es un parámetro esencial para el diagnóstico y control del asma. El índice más empleado es la variabilidad del PEF respecto a la media registrada durante dos semanas de mediciones seriadas antes de tomar la medicación (68). Una variabilidad del PEF $> 20\%$ apoya el diagnóstico del asma (2).

En aquellos pacientes con una espirometría normal en los que la sospecha de asma persiste, puede ser de ayuda el análisis de la hiperreactividad bronquial. Para ello, se utilizan pruebas de provocación bronquial con agentes broncoconstrictores como la metacolina, empleando una concentración que provoque la reducción del FEV₁ un 20 % (PC₂₀metacolina). Esta prueba tiene una elevada sensibilidad, una especificidad limitada y un alto valor predictivo negativo, por lo que no resulta muy útil para confirmar el diagnóstico del asma, pero sí para descartarlo (69,70).

Por último, como complemento a las pruebas funcionales, la medición de la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO) es útil para analizar el nivel de inflamación bronquial de las vías respiratorias, siendo un procedimiento no invasivo y estandarizado (71). El punto de corte diagnóstico recomendado recientemente se ha establecido en 40 ppb en adultos que no estén tomando glucocorticoides (2). Sin embargo, valores normales de FeNO no excluyen el diagnóstico del asma, especialmente en personas no atópicas, además de que también está implicado en otras patologías (72).

c) Diagnóstico etiológico

Es necesario intentar identificar la causa del asma. En este sentido, la posible base alérgica de la enfermedad se estudia a través de pruebas cutáneas intraepidérmicas con una batería estandarizada de aeroalérgenos adaptada a la zona geográfica. Estas pruebas presentan una elevada sensibilidad y bajo coste, por lo que son el método de elección a pesar de que pueden presentar interferencias. Asimismo, se pueden determinar los niveles de IgE total y de IgE específica (incluyendo el diagnóstico por componentes) frente a alguno de los alérgenos, prueba que tiene mayor especificidad y coste. Tanto las pruebas cutáneas como los niveles de IgE determinan la existencia de sensibilización frente a alérgenos y se suelen emplear complementariamente, pero es necesario evaluar el grado de relevancia clínica ante un resultado positivo (73,74).

1.1.6. Clasificación

El asma es un síndrome heterogéneo que resulta de complejas interacciones entre factores genéticos y ambientales. Esta diversidad de interacciones da lugar a la variabilidad observada en los pacientes asmáticos en lo que respecta a edad de comienzo, presentación clínica, perfil inflamatorio y respuesta al tratamiento (64). Debido a esto, múltiples estudios han sugerido la clasificación de los pacientes asmáticos según determinadas características demográficas, fisiopatológicas o clínicas, caracterizando así diferentes fenotipos de la enfermedad asmática (75–78).

Los fenotipos del asma se pueden agrupar en tres grandes categorías, según criterios clínicos o fisiológicos, criterios relacionados con factores desencadenantes o criterios inflamatorios (Tabla 1). Hay que tener en cuenta que puede existir solapamiento entre las distintas categorías y que, además, un mismo paciente puede pasar de un fenotipo a otro en función de interacciones con el entorno (75).

Tabla 1. Clasificación de los fenotipos del asma en categorías. Tomada de (2).

Categorías	Fenotipos
Criterios clínicos o fisiológicos	Asma grave
	Asma con exacerbaciones graves
	Asma refractaria al tratamiento
	Asma de inicio precoz
	Asma de inicio tardío
	Asma con limitación fija al flujo aéreo
Criterios relacionados con factores desencadenantes	Asma y obesidad
	Asma alérgica
	Asma inducida por AINE
Criterios inflamatorios	Asma inducida por menstruación
	Asma inducida por ejercicio
	Asma eosinofílica
	Asma neutrofílica
	Asma paucigranulocítica

AINE: antiinflamatorios no esteroideos.

No obstante, en la actualidad no existen pruebas concluyentes para recomendar diferencias en el tratamiento del asma basadas en la presencia de los distintos fenotipos. Aunque es posible que se tienda a una caracterización fenotípica en todos los niveles de gravedad del asma, únicamente se considera que en el asma grave no controlada la

caracterización de fenotipos puede ser de ayuda para orientar hacia tratamientos específicos (79).

Por otro lado, debido a que los fenotipos describen características observables en los pacientes, pero no aportan información sobre la etiología del asma, se propuso la utilización del término endotipo para hablar de un subtipo de la enfermedad en el que se identifica un mecanismo fisiopatológico común (80). En este sentido, comprender la fisiopatología subyacente en cada endotipo es fundamental para intentar dirigir y optimizar el tratamiento de los pacientes (81).

a) Patrón inflamatorio

Tradicionalmente se ha considerado que el asma presenta un patrón inflamatorio T2, fuertemente asociado a la presencia de atopia y eosinofilia. Sin embargo, existe heterogeneidad en cuanto a los mecanismos moleculares subyacentes en esta patología. A partir del análisis molecular realizado por Woodruff *et al.* (82) en pacientes asmáticos, se identificó por primera vez el perfil de expresión génica asociado a diferentes subgrupos, denominados “Th2 alto” y “Th2 bajo”, observándose diferencias entre ambos, principalmente, en relación con la respuesta a los glucocorticoides.

Asma T2

El patrón inflamatorio T2 es el predominante y más estudiado en el asma, caracterizándose por la presencia de citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13, niveles elevados de FeNO y eosinofilia en sangre y esputo, siendo estos sus biomarcadores clásicos. En muchas ocasiones se acompaña de atopia, con incremento de IgE total y específica (82,83). Asimismo, se ha demostrado que el tratamiento con glucocorticoides inhalados es eficaz y mejora la función pulmonar en estos pacientes (84,85). Actualmente, en pacientes que reciben dosis elevadas de glucocorticoides inhalados o glucocorticoides orales diarios, la GINA considera la posibilidad de una inflamación T2 si existe al menos una de las siguientes condiciones: eosinófilos en sangre $\geq 150/\mu\text{l}$, FeNO ≥ 20 ppb, eosinófilos en esputo $\geq 2\%$ o sensibilización alérgica (3).

Dentro del asma T2 se incluyen fenotipos clínicamente distintos que pueden mostrar cierto grado de superposición, como son el asma alérgica y el asma eosinofílica (Figura 6) (86).

Asma no T2

Su definición es más compleja debido a la falta de biomarcadores propios. Muestra escasa eosinofilia y niveles bajos de FeNO, por lo que se caracteriza principalmente por la ausencia de inflamación tipo T2, que debe ser descartada con precaución, sobre todo en los pacientes que reciben tratamiento con glucocorticoides orales. En cambio, destacan otros perfiles moleculares más relacionados con la presencia de neutrofilia, como el perfil Th17 o el perfil Th1, en los que se observa un aumento de IL-17 o interferón gamma (IFN- γ), respectivamente (87).

Este patrón inflamatorio incluye diferentes fenotipos como el asma neutrofílica o el asma paucigranulocítica (Figura 6), asociándose también con la obesidad, el inicio de enfermedad en la edad adulta, la resistencia a los glucocorticoides y la exposición a factores externos como bacterias, hongos o tabaquismo (88).

b) Gravedad clínica

En la actualidad, la clasificación más aceptada de la enfermedad asmática se basa en su gravedad, que refleja la intensidad del proceso inflamatorio y permite tomar decisiones en cuanto al tratamiento. Habitualmente, la gravedad del asma se valora cuando el paciente está siendo tratado, reevaluándose periódicamente, y se clasifica en función de las necesidades de tratamiento farmacológico requeridas para lograr el control de la enfermedad (89). Existen cuestionarios estandarizados y validados para evaluar objetivamente el nivel de control del asma en el paciente, como el test de control del asma (ACT) (90). También es importante valorar la presencia de exacerbaciones, definidas como episodios de empeoramiento de la situación basal del paciente que requieren modificaciones en el tratamiento. En este sentido, según la GEMA, la gravedad del asma se clasifica en cuatro categorías: intermitente, persistente leve, persistente moderada y persistente grave (2).

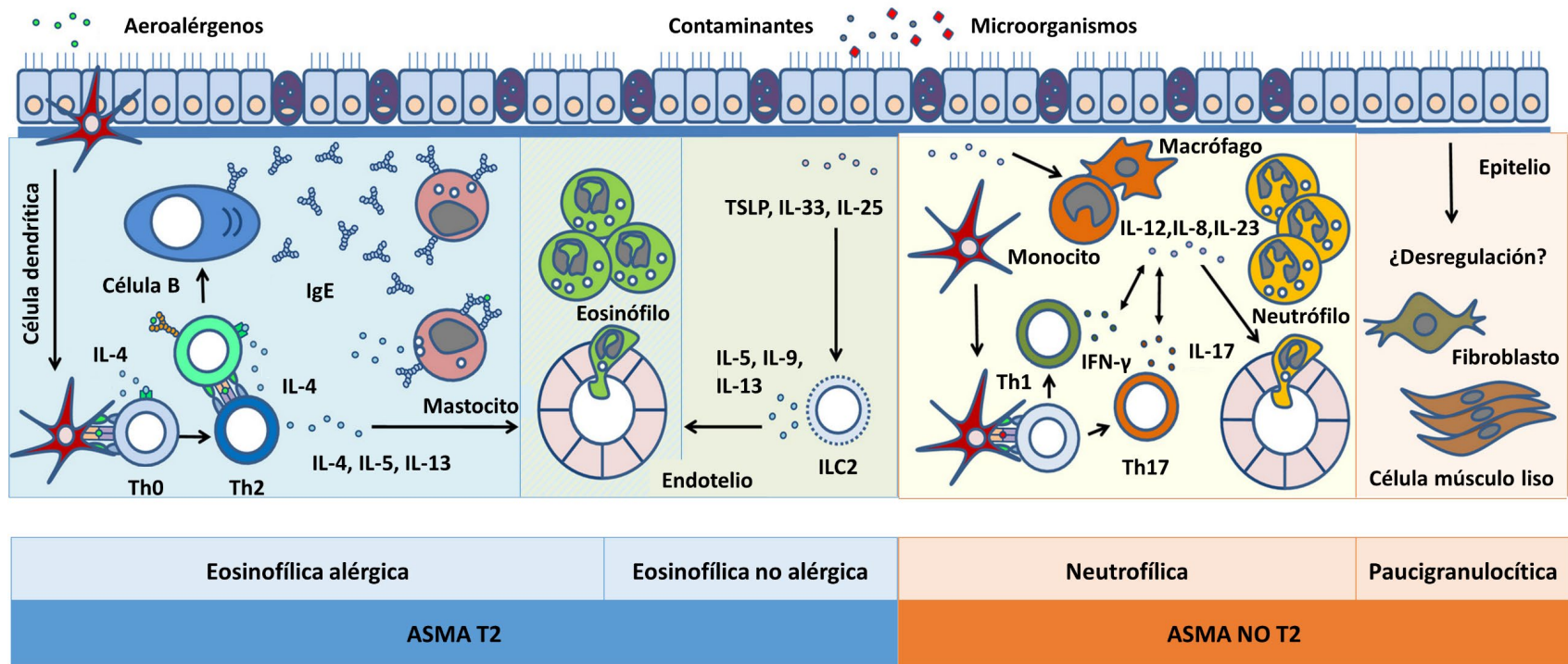


Figura 6. Fenotipos del asma según el patrón inflamatorio T2 y no T2. Adaptada de (93).

El asma grave se caracteriza por la necesidad de precisar tratamiento basal con múltiples fármacos y a altas dosis para prevenir un mal control de la enfermedad, o que persiste mal controlada a pesar del tratamiento (91). En estos pacientes se observa heterogeneidad en cuanto al patrón inflamatorio, clasificándose en función de la presencia o ausencia de eosinófilos y neutrófilos en la vía respiratoria, lo cual se relaciona con las diferentes respuestas al tratamiento (75). Por ello, se han establecido diferentes fenotipos del asma grave atendiendo a la fisiopatología, la sintomatología, la etiología y la respuesta terapéutica (77,78).

Asma alérgica (T2)

El fenotipo alérgico supone casi el 50 % de los casos de asma grave, por lo cual ha sido ampliamente estudiado. Los pacientes presentan una base atópica, con pruebas cutáneas positivas y, frecuentemente, antecedentes familiares y niveles séricos elevados de IgE. Debido a la existencia de cierta relación entre la atopia y la edad de inicio del asma, este fenotipo suele asociarse con el asma de inicio precoz (76). Asimismo, se relaciona con una mejor función pulmonar y respuesta a los glucocorticoides, aunque se observa un mayor número de exacerbaciones (92). Además, se caracteriza por presentar un patrón inflamatorio T2 con predominio de eosinófilos y, en ocasiones, presencia también de neutrofilia en esputo (93). En aquellos pacientes con un componente T2 muy activo, los niveles séricos de periostina y de FeNO son buenos biomarcadores de la enfermedad (94,95).

Asma eosinofílica (T2)

Alrededor del 25 % de los casos de asma grave se relacionan con este fenotipo, caracterizado por la persistencia de eosinófilos en esputo (> 2 %) a pesar del tratamiento con altas dosis de glucocorticoides, así como por un mayor número de exacerbaciones, disminución de la función pulmonar y peor control de la enfermedad (96,97). Generalmente, se manifiesta después de los 20 años y, con frecuencia, se asocia con la presencia de poliposis nasosinusal y EREA, mientras que la prevalencia de atopia y de antecedentes familiares es menor (92). No obstante, los niveles de IgE y de FeNO pueden encontrarse igualmente elevados. Además, se ha observado que las alteraciones

del metabolismo del ácido araquidónico están implicadas en su patogenia, asociadas en ocasiones a inflamación tipo T2 (95,98). En este sentido, la elevada producción de IL-5 identificada en estos pacientes se podría relacionar con la presencia de inflamación eosinofílica en ausencia de un proceso alérgico (99). Debido a esto, los pacientes asmáticos que presentan este fenotipo constituyen buenos candidatos para recibir tratamiento con terapias biológicas anti-IL-5.

Asma neutrofílica (no T2)

Los pacientes que presentan este fenotipo suelen manifestar limitación crónica al flujo aéreo, con un importante atrapamiento, antecedentes de tabaquismo y exposición a factores irritantes e infecciosos. Los mecanismos implicados en la inflamación no T2 se desconocen aún, aunque el predominio de neutrófilos en la vía respiratoria podría relacionarse con la inflamación residual resultante tras el uso continuado de glucocorticoides, ya que inhiben la apoptosis de estas células. Además, el tratamiento con glucocorticoides resulta poco eficaz en estos pacientes (100,101). También se ha descrito un aumento de MMP-9 (102) y de mieloperoxidasa e IL-8 (103) relacionado con la inflamación neutrofílica.

Asma grave asociada a obesidad

La relación entre asma y obesidad es compleja, debido a que no se conoce bien su etiopatogenia. Generalmente, este fenotipo predomina en mujeres no atópicas adultas, en la quinta década de vida, con un elevado índice de masa corporal, exacerbaciones frecuentes y mala respuesta al tratamiento con glucocorticoides. También se relaciona con una función pulmonar poco alterada y niveles bajos de eosinofilia y de FeNO (104,105). Se ha sugerido que el peor control de la enfermedad en estos pacientes podría estar relacionado con factores hormonales o con la presencia de otras comorbilidades (104,106). La pérdida de peso podría ser importante como tratamiento, demostrándose una mejoría en el control de la enfermedad en pacientes con patrón inflamatorio no T2 (107). No obstante, según la última actualización de la GEMA, en la práctica clínica se utilizan principalmente los tres fenotipos anteriores, debido a su mayor implicación en la decisión terapéutica (2).

1.1.7. Tratamiento

Los principales objetivos del tratamiento del asma son lograr y mantener el control de la enfermedad lo antes posible, prevenir las exacerbaciones y la obstrucción crónica al flujo aéreo e intentar reducir al máximo su mortalidad. Además, el tratamiento debe ser evaluado de forma periódica y modificarse escalonadamente en función de la gravedad de la enfermedad, con el objetivo de alcanzar un control óptimo utilizando el menor número de fármacos y dosis posible. Tanto el control actual de los síntomas diarios como las consecuencias futuras pueden alcanzarse en un alto porcentaje de pacientes mediante un tratamiento adecuado (2). No obstante, existen pacientes que no responden adecuadamente a ningún tratamiento.

a) Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico en el paciente asmático se basa en la combinación de fármacos antiinflamatorios y broncodilatadores, que pueden clasificarse en dos grandes grupos según diferencias en la dosificación, denominándose fármacos de control o mantenimiento y fármacos de alivio o rescate (2).

Fármacos de control o mantenimiento

Deben administrarse a diario durante periodos prolongados. En este grupo están incluidos los glucocorticoides inhalados o sistémicos (budesónida y beclometasona), los antagonistas de los receptores de leucotrienos (montelukast y zafirlukast), los agonistas β_2 -adrenérgicos de acción larga (salmeterol, formoterol y otros), el tiotropio y otros anticolinérgicos de acción prolongada y los anticuerpos monoclonales. Los glucocorticoides son los fármacos antiinflamatorios más utilizados y constituyen la primera línea de tratamiento del asma (Figura 7).

Fármacos de alivio o rescate

Se utilizan a demanda para tratar o prevenir la broncoconstricción de forma rápida en las crisis asmáticas. Entre ellos se incluyen los agonistas β_2 -adrenérgicos de acción corta inhalados (salbutamol), que son el tratamiento de elección, y alguno de los anticolinérgicos inhalados (bromuro de ipratropio).

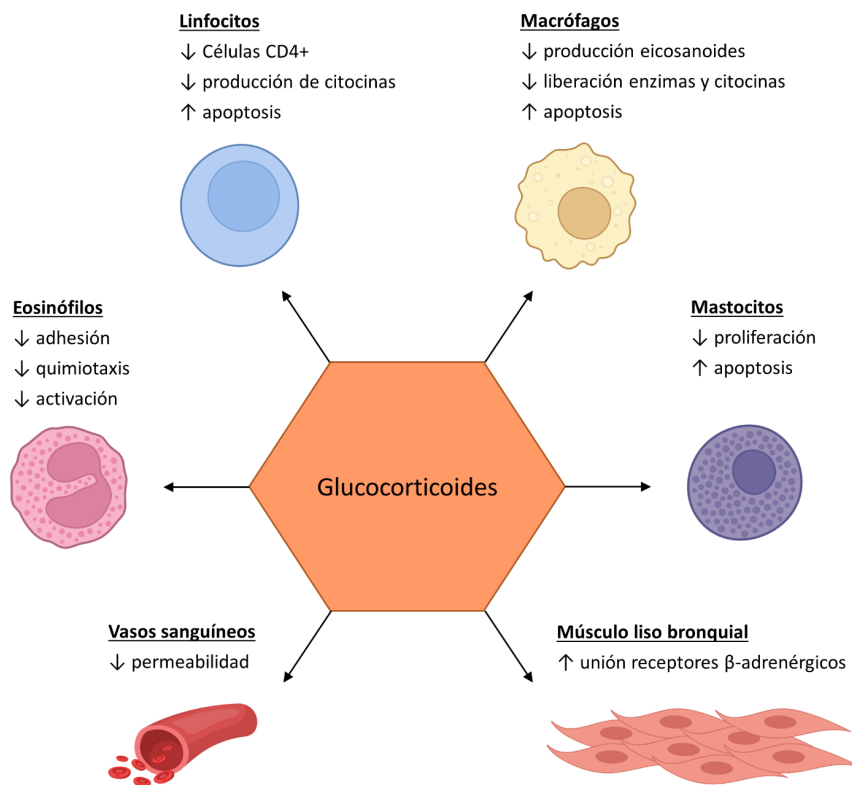


Figura 7. Mecanismos de acción de los glucocorticoides en el asma. Adaptada de (111) con imágenes tomadas de Biorender.com

b) Inmunoterapia con alérgenos

La inmunoterapia por vía subcutánea o sublingual con vacunas de alérgenos es un tratamiento eficaz en pacientes con asma alérgica bien controlada, ya que reduce los síntomas de la enfermedad y la necesidad de tratamiento con fármacos de mantenimiento y de rescate (108). Previamente debe demostrarse la existencia de sensibilización mediada por IgE frente a alérgenos comunes, generalmente pólenes y ácaros, utilizando extractos estandarizados. Esta terapia no está indicada en pacientes

con asma grave o mal controlada debido a la disminución de su eficacia y al riesgo de sufrir reacciones adversas (109).

c) Terapias biológicas

Debido al avance en el conocimiento de la fisiopatología del asma, en los últimos años se han desarrollado nuevas terapias basadas en anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas específicas que intervienen en el proceso inflamatorio. No obstante, en ocasiones los clínicos no disponen de las herramientas adecuadas para cuantificar el grado de respuesta de los diferentes pacientes, ya que no todos responden igual de bien. Debido a esto, en la actualidad, se están desarrollando herramientas de medición válidas para evaluar la respuesta a estas nuevas terapias (110,111).

Principalmente, destacan los tratamientos biológicos dirigidos contra la IgE y las interleucinas IL-4 e IL-5, que se utilizan en pacientes con asma grave mal controlada con los tratamientos farmacológicos convencionales, clasificándolos en función de los fenotipos previamente descritos.

Omalizumab

Es un anticuerpo monoclonal IgG1 κ recombinante humanizado dirigido contra la región Fc de la IgE, que impide la unión a su receptor, Fc ϵ RI, expresado en la superficie de mastocitos y basófilos. El tratamiento con omalizumab provoca una reducción de los niveles de IgE libre circulante y reduce la expresión de Fc ϵ RI en los mastocitos y basófilos, inhibiendo la secreción de mediadores inflamatorios (112,113). Se ha demostrado su eficacia en pacientes con asma grave y sensibilización alérgica, siendo capaz de reducir las exacerbaciones y el uso de altas dosis de glucocorticoides, además de mejorar los síntomas de la enfermedad y la calidad de vida de los pacientes (114,115).

Dupilumab

Es un anticuerpo monoclonal IgG1 κ completamente humano que actúa como antagonista del receptor de la IL-4 al unirse a la subunidad α (IL-4RA) de este complejo, compartido con la IL-13, bloqueando por tanto la acción de ambas interleucinas. En pacientes con asma moderada-grave eosinofílica dependiente de glucocorticoides se ha

observado una reducción de las exacerbaciones, la función pulmonar y los biomarcadores asociados a la respuesta inflamatoria tipo T2 (116,117).

Mepolizumab

Es un anticuerpo monoclonal IgG1 κ recombinante humanizado que actúa bloqueando a la IL-5 y evita su unión a IL-5R, situado en la superficie de eosinófilos y basófilos (Figura 8). Se ha observado una disminución en el recuento de eosinófilos en sangre y esputo en pacientes tratados con mepolizumab. Además, la tasa de reducción de las exacerbaciones aumenta cuanto mayor sea el recuento basal de eosinófilos (118), observándose una mejoría de los síntomas, la función pulmonar y la calidad de vida de los pacientes con asma grave de fenotipo eosinofílico (119,120), así como una reducción en el uso de glucocorticoides orales (121).

Reslizumab

Es un anticuerpo monoclonal IgG4 κ humanizado dirigido contra la IL-5 que inhibe su unión a IL-5R (Figura 8). En pacientes con asma eosinofílica mal controlada en tratamiento con dosis medias-altas de glucocorticoides inhalados, se ha demostrado una reducción significativa de las exacerbaciones y del recuento de eosinófilos en sangre periférica, además de una mejoría de la función pulmonar y el control del asma (122,123).

Benralizumab

Es un anticuerpo monoclonal IgG1 κ recombinante humanizado y afucosilado que se une con alta afinidad y especificidad a la subunidad α del receptor de la IL-5 (IL-5RA) mediante su región Fab, bloqueando la acción de la IL-5 e inhibiendo, por tanto, la activación y proliferación de los eosinófilos (124). Además, mediante su región Fc afucosilada, se une al receptor Fc γ RIIIa expresado en la superficie de los linfocitos citolíticos naturales (NK: *natural killer*), los macrófagos y los neutrófilos, induciendo la apoptosis de los eosinófilos y los basófilos a través de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (Figura 8). La administración de benralizumab provoca una marcada reducción en el recuento de eosinófilos en sangre periférica, esputo y médula ósea (125). En varios estudios clínicos en pacientes con asma grave

eosinofílica no controlada con altas dosis de glucocorticoides inhalados, se ha conseguido una reducción significativa de las exacerbaciones y una mejoría de la función pulmonar y el control de la enfermedad (126,127), así como una reducción en el uso de glucocorticoides orales (128).

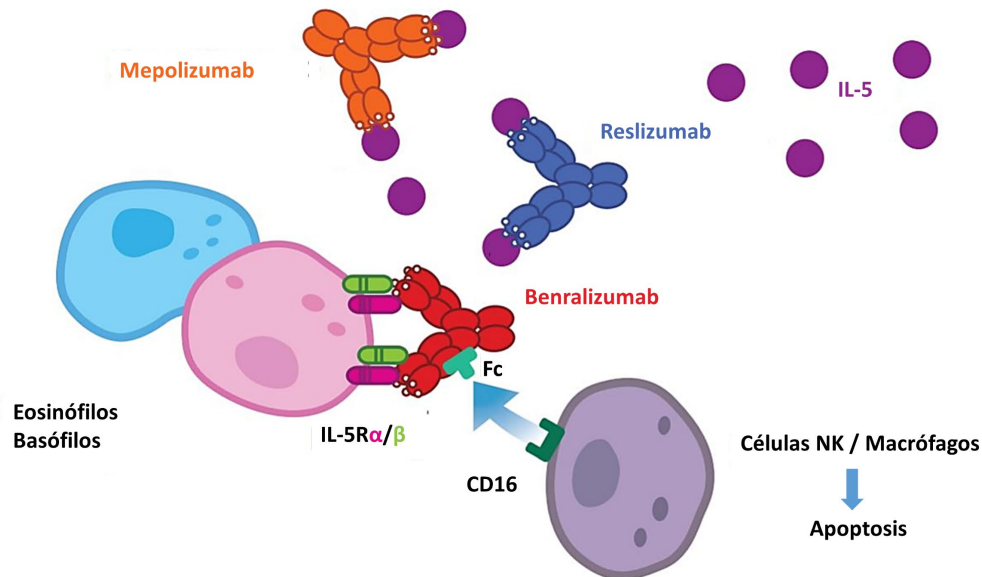


Figura 8. Terapias biológicas basadas en anticuerpos monoclonales dirigidas contra la interleucina 5 y su receptor. Adaptada de (131).

1.2. GENÉTICA DEL ASMA

Los estudios de segregación familiar y en gemelos mono y dicigóticos, llevados a cabo en la década de los 80, demostraron la existencia de un importante componente genético en la enfermedad asmática ya evidenciado a principios del siglo XX (129–133). A partir de los resultados de estos estudios, se puso de manifiesto que el asma no sigue un patrón de herencia mendeliana clásico, sino que consiste en un síndrome multifactorial resultante de la interacción entre diversos factores genéticos y ambientales (134).

A partir de la década de los 90, se comenzó a entender el asma como una enfermedad compleja en la que existe una amplia variedad de fenotipos, consecuencia de la influencia de numerosos genes. El desarrollo de la genética molecular y las nuevas

técnicas de análisis masivo u *ómicas*, como la genómica y la transcriptómica, han supuesto un gran avance tecnológico para el estudio de enfermedades complejas como el asma (135).

1.2.1. Estudios genéticos

Se han utilizado diferentes estrategias para la búsqueda de genes asociados con el asma, entre las que destacan estudios genéticos como los estudios de análisis de ligamiento en todo el genoma y los estudios de asociación de genes candidatos.

a) Estudios de ligamiento

Los estudios de ligamiento fueron la primera aproximación empleada en el estudio genético del asma. Se realizan en familias con individuos que padecen una determinada enfermedad con el objetivo de analizar marcadores genéticos distribuidos a lo largo de todo el genoma y observar si alguno de ellos es más frecuente en los individuos afectados. Las regiones del genoma que albergan *loci* de susceptibilidad entre enfermos emparentados serán compartidas con mayor frecuencia de lo esperado por el azar. Así, se consigue obtener información de alelos con gran efecto fenotípico que confieren riesgo para el desarrollo de la enfermedad (136,137).

La ventaja de los estudios de ligamiento es que permiten identificar nuevos genes y rutas implicadas en patologías complejas como el asma. No obstante, suponen una mayor imprecisión en cuanto a la localización de los genes con susceptibilidad al asma, debido a que las regiones cromosómicas identificadas mediante estos estudios son extensas. Por ello, a continuación, habría que hacer un estudio más exhaustivo de estas regiones y de los genes candidatos (138,139).

b) Estudios de asociación

Los estudios de asociación de genes candidatos consisten en el estudio poblacional de una selección de genes que intervienen en una determinada enfermedad. Se basan en la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas entre

individuos sanos y enfermos no emparentados (138). El estudio de haplotipos en la población enferma permite determinar regiones compartidas y localizar genes implicados en la enfermedad, siendo el haplotipo la combinación de marcadores genéticos contenidos en un cromosoma que tienden a heredarse juntos (136).

Estos estudios tienen la ventaja, ante un mismo tamaño de muestra, de poseer una mayor precisión y capacidad de detección de genes con un efecto moderado en la enfermedad. Además, conseguir la colaboración de un elevado número de individuos enfermos no emparentados es más sencillo que en el caso de familias (137). No obstante, la existencia de falsos positivos debidos a la estratificación de la población puede provocar diferencias entre individuos que no se deban a la enfermedad, generando confusión en los resultados de asociación. Esto puede resolverse mediante métodos estadísticos que permitan corregir las desviaciones poblacionales (140,141).

Estudios de genoma completo (GWAS: *Genome Wide Association Studies*)

Los estudios de genoma completo son un tipo de estudios de asociación en los que se analizan miles de variantes genéticas a lo largo del genoma, principalmente polimorfismos de nucleótido único (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*), con el objetivo de determinar cuáles están asociadas con la susceptibilidad a padecer una determinada enfermedad. Para su realización se emplean *microarrays* o micromatrices de ADN, que permiten el análisis masivo de un gran número de SNPs por paciente (142). Actualmente, éstos han sido reemplazados por la secuenciación de alto rendimiento o *Next Generation Sequencing* (NGS), basándose en la secuenciación del ARNm (RNA-seq), que permite obtener millones de secuencias cortas del genoma de una muestra y determinar los niveles de expresión de genes con mayor precisión. También se utiliza la secuenciación del ADN genómico completo o del exoma para analizar SNPs a escala *ómica* (143,144).

La ventaja de este tipo de estudios es que permiten la transcripción simultánea de múltiples genes, lo cual ofrece la posibilidad de identificar grupos de genes relacionados a nivel funcional. De esta manera se pueden descubrir vías funcionales alteradas en una determinada enfermedad o asociadas a un fenotipo clínico concreto (145). Además, puede analizarse la expresión diferencial de genes entre grupos

de controles y pacientes o entre pacientes antes y después de un determinado tratamiento, con el objetivo de identificar genes o potenciales biomarcadores que ayuden al diagnóstico o tratamiento de la enfermedad (146,147). En este sentido, es muy importante una correcta caracterización clínica de la población, sobre todo de los controles, y alcanzar un tamaño muestral grande para lograr un adecuado poder estadístico en el estudio. También es necesaria la utilización de herramientas bioinformáticas avanzadas para el posterior procesamiento de la gran cantidad de datos obtenidos, lo cual limita la replicación de los resultados y, por lo tanto, las conclusiones extraídas deben tomarse con precaución (148,149).

1.2.2. Genes asociados con el asma

En las últimas décadas se han llevado a cabo cientos de estudios genéticos de asma en distintas poblaciones y con los diferentes fenotipos de la enfermedad. La gran variedad de genes cuya asociación con el asma ha sido descrita pone de manifiesto la heterogeneidad y complejidad de esta patología (140). La mayoría de estas asociaciones se corresponden con polimorfismos en genes que codifican proteínas implicadas en alguna de las rutas relacionadas con la fisiopatología del asma (Figura 9).

Estos genes pueden clasificarse en cuatro grupos según su implicación: genes que intervienen en la respuesta inmune innata (grupo 1), genes que regulan la respuesta tipo T2 (grupo 2), genes asociados a la inmunidad de las mucosas (grupo 3) y genes que intervienen en la función pulmonar (grupo 4) (139). Asimismo, mediante estudios de ligamiento por clonación posicional, se han identificado varios genes que no se sabía que estuvieran involucrados en el asma, como la metaloproteasa ADAM33, implicada en la remodelación bronquial (150). De esta manera se han descubierto nuevas rutas patogénicas implicadas en la enfermedad.

El principal problema de estos estudios es la baja tasa de replicabilidad demostrada, debido a limitaciones metodológicas como son un tamaño muestral pequeño o un diseño incorrecto del estudio. En este sentido, varias revisiones han indicado que aproximadamente la mitad de los genes publicados han podido ser

replicados en otros estudios (Figura 10) (139,141). Concretamente, existen diez genes cuya asociación con el asma o fenotipos relacionados ha conseguido ser replicada en más de diez estudios independientes, por lo que han sido sugeridos como fuertes candidatos de susceptibilidad al asma. Entre ellos se encuentran, por orden de localización cromosómica, los genes codificantes de la IL-4 e IL-13 (*IL4* y *IL13*; 5q23), el gen codificante del antígeno de diferenciación CD14 (*CD14*; 5q31), el gen codificante del receptor beta 2 adrenérgico (*ADRB2*; 5q32), los genes codificantes de los antígenos leucocitarios humanos (*HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*; 6p21), el gen codificante del factor de necrosis tumoral (*TNF*; 6p21), el gen codificante de la cadena beta del FcεRI (*FCER1B*; 11q13), el gen codificante de IL-4RA (*IL4RA*; 16p12) y el gen codificante de la metaloproteasa ADAM33 (*ADAM33*; 20p13).

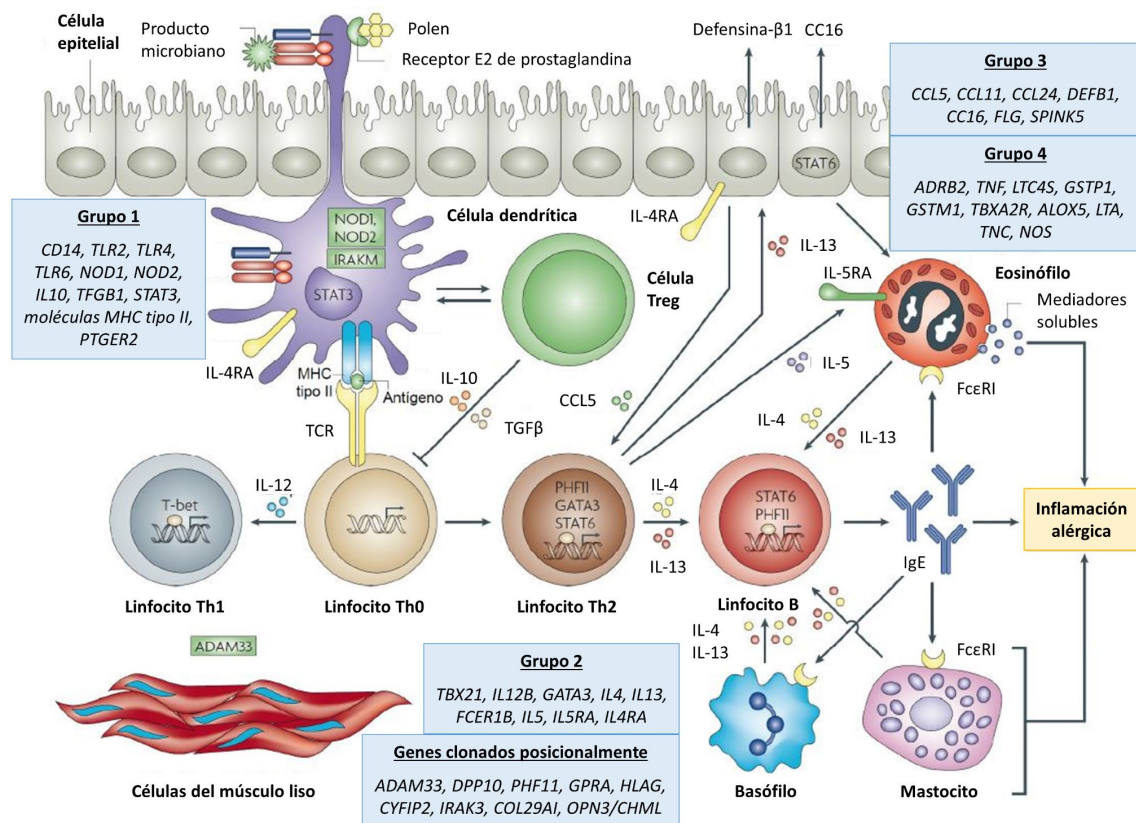


Figura 9. Representación de los genes asociados con la fisiopatología del asma. Adaptada de (142).

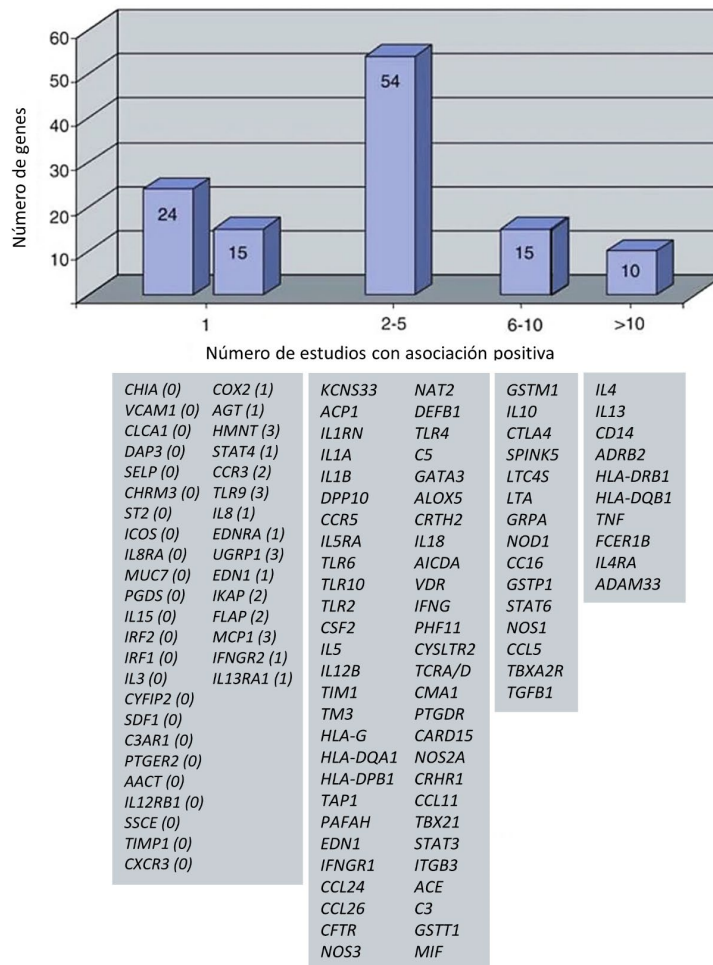


Figura 10. Genes asociados con el asma o fenotipos relacionados en al menos un estudio. Los genes que han sido asociados en una sola población se dividen en aquellos de los que no se han publicado estudios de replicación y aquellos que no fueron replicados en estudios posteriores. Adaptada de (141).

1.2.3. Farmacogenética en el asma

La farmacogenética consiste en el estudio de la base genética responsable de la variabilidad interindividual existente en la respuesta a los fármacos, tanto en lo que se refiere a eficacia terapéutica como a efectos adversos (151). Generalmente, las variantes genéticas implicadas son polimorfismos presentes en genes involucrados en la patología. Los mecanismos por los cuales estos polimorfismos originan una respuesta farmacológica variable pueden ser debidos a alteraciones en su farmacocinética o farmacodinámica, lo que provoca un aumento o disminución de su acción. También pueden estar implicadas las variantes genéticas existentes en las dianas sobre las que

actúan los fármacos o en genes codificantes de enzimas necesarias para su metabolización (152,153).

En cuanto a la enfermedad asmática, existe una elevada variabilidad en la respuesta al tratamiento, aproximadamente entre un 70-80 %, incluso en pacientes con el mismo fenotipo (154). Esto se relaciona con la mala adherencia al tratamiento, la influencia de diferentes factores ambientales y la elección incorrecta de los fármacos. No obstante, en la mayoría de los casos no se pueden explicar las causas de estas diferencias, lo cual sugiere la influencia de un componente genético (151). En este sentido, se han realizado estudios de genes candidatos para la búsqueda de polimorfismos en genes asociados con la respuesta a los distintos fármacos empleados en el asma. Concretamente, se ha demostrado que la presencia de polimorfismos en el gen *ADRB2* tienen como consecuencia variaciones en la acción de los agonistas β_2 -adrenérgicos. También se ha demostrado en los genes *LTC4* y *ALOX5*, en relación a los antagonistas de leucotrienos, o en el gen *CRHR1* y la acción de los corticosteroides inhalados (155–157).

Medicina de precisión

La farmacogenética representa una de las herramientas más importantes en el área de la medicina de precisión, cuyo objetivo es la optimización del tratamiento a nivel individual, es decir, hacia una terapia personalizada. Así, mediante la medicina de precisión se intenta seleccionar a los pacientes en función de su respuesta a un determinado fármaco, además de seleccionar el fármaco y la dosis más adecuada para un determinado paciente (Figura 11). Esto supone grandes ventajas en la relación coste-beneficio, evitando el uso innecesario de tratamientos no efectivos, retrasos en la administración de los tratamientos efectivos y la aparición de reacciones adversas (158,159).

La implementación de la medicina de precisión requiere la identificación de biomarcadores específicos que proporcionen información predictiva de confianza para la elección de una estrategia terapéutica óptima. Idealmente, un biomarcador debería tener relevancia clínica, mostrando diferencias entre individuos sanos y enfermos, además de alta sensibilidad y especificidad, siendo fácilmente medible, reproducible e

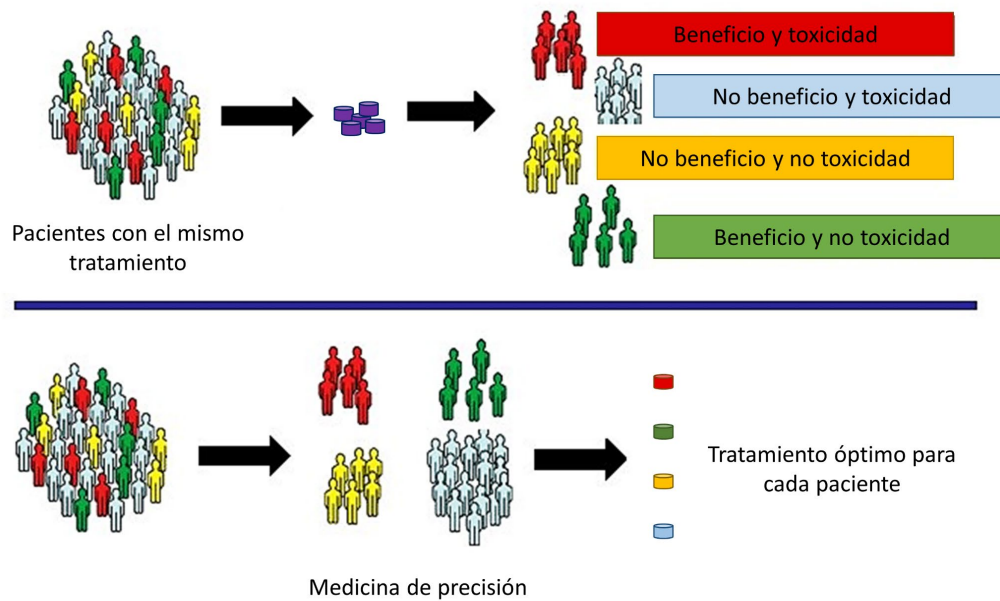


Figura 11. Enfoque terapéutico de la medicina de precisión.

intentando que sea lo menos invasivo posible (160). Para su búsqueda, debido a la heterogeneidad clínica del asma, es necesaria una correcta clasificación de los pacientes en subgrupos o endotipos, basándose en los mecanismos fisiopatológicos subyacentes. Así, en los últimos años se han realizado estudios de agrupamientos y desarrollado estrategias, como los enfoques *ómicos*, para la búsqueda de nuevas dianas para el tratamiento del asma, centrándose sobre todo en la vía de las citocinas Th2. Los avances más recientes en cuanto al tratamiento se relacionan con la utilización de terapias biológicas en pacientes con asma grave. Estas terapias son muy específicas, debido a que sus acciones van dirigidas a citocinas concretas o a sus receptores, pero económicamente son más caras que el resto de tratamientos. Por lo tanto, han servido para reforzar la importancia de la aplicación de la medicina de precisión en el asma grave, ya que es necesario seleccionar al paciente idóneo para recibir estos tratamientos (161,162).

Los biomarcadores del asma que han sido identificados en la actualidad se utilizan para predecir la respuesta a diferentes estrategias terapéuticas basadas en los endotipos. No obstante, existe un importante solapamiento entre los diferentes biomarcadores. Además, la mayoría de ellos no son lo suficientemente específicos para seleccionar subgrupos de pacientes que responderán a un tratamiento dirigido

determinado, por lo que aún están en periodo de validación. Esto podría deberse a diversos factores como la genética o la falta de conocimiento sobre la vía inflamatoria implicada (163).

La eosinofilia en sangre periférica es un biomarcador de inflamación ampliamente utilizado en pacientes asmáticos debido a su implicación en la respuesta tipo T2. Se ha asociado con la respuesta a los glucocorticoides y, recientemente, también con las terapias biológicas anti-IL-4/IL-13 y anti-IL-5 (163). Sin embargo, al activarse los eosinófilos en sangre periférica migran rápidamente al tejido pulmonar, por lo que la asociación entre ellos y la inflamación en las vías respiratorias podría ser transitoria. Además, los recuentos bajos de eosinófilos en sangre periférica podrían no reflejar con exactitud la ausencia de eosinofilia en las vías respiratorias. Aunque se está estudiando, aún no se ha podido demostrar con seguridad la relación de la eosinofilia en sangre periférica con la eosinofilia en esputo inducido, considerada el *gold standard*, por lo que en la actualidad no pueden utilizarse indistintamente (164,165).

1.3. IL-5RA Y SU IMPLICACIÓN EN EL ASMA

1.3.1. Interleucina 5

Desde su descubrimiento, la IL-5 también ha sido conocida como factor de reemplazo de células T (TRF), factor II de crecimiento de células B (BCGFII) y factor de diferenciación eosinofílica (EDF) (166). Esta glicoproteína homodimérica de 15-30 kDa pertenece a una familia de citocinas muy conservada evolutivamente, que incluye la IL-3, IL-4, IL-13 y GM-CSF, siendo todas ellas codificadas por genes localizados en el brazo largo del cromosoma 5 (167).

La IL-5 es secretada principalmente por los linfocitos Th2 activados y los mastocitos, además de por los eosinófilos, los basófilos, las ILC2 y las células NKT invariantes (168–172). En cuanto a su función, desempeña un papel esencial en la proliferación y diferenciación de las células precursoras de los eosinófilos en la médula ósea (173,174) y la diferenciación de las células B activadas a células secretoras de

anticuerpos (175), así como un papel modulador en el desarrollo y la función de los basófilos y los mastocitos (176). Asimismo, regula la migración de los eosinófilos a las vías respiratorias y otros tejidos, ya que actúa en la activación celular de los mismos, aumenta su adhesión a las células endoteliales, promueve la quimiotaxis y prolonga la supervivencia celular de éstos al prevenir la muerte por apoptosis (177,178).

Por ello, la participación de la IL-5 es fundamental en el desarrollo de la respuesta inmunitaria alérgica e inflamatoria que caracteriza a numerosas enfermedades como el asma, la dermatitis atópica, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, las enfermedades gastrointestinales eosinofílicas, el síndrome hipereosinofílico, la granulomatosis eosinofílica con poliangéititis o la poliposis nasosinusal eosinofílica (179–182).

1.3.2. Receptor de la interleucina 5

La IL-5 actúa sobre las células diana mediante la interacción con su receptor específico, IL-5R, expresado principalmente en la membrana de los eosinófilos, así como en los basófilos, las células precursoras de ambos y los mastocitos (183,184). Recientemente también se ha confirmado la presencia y funcionalidad de IL-5R en células humanas del epitelio bronquial *in vitro* (185) e incluso en neutrófilos (186).

a) Estructura molecular

El receptor IL-5R es una glicoproteína heterodímera de 47,68 kDa formada por un dominio extracelular, que contiene el extremo N-terminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, que contiene el extremo C-terminal (187). Consta de una subunidad alfa, IL-5RA, que se une específicamente a la IL-5, y una subunidad beta común a los receptores de la IL-3 y el GM-CSF, que no se une directamente a la interleucina pero es necesaria para aumentar la afinidad de unión y la transducción de señales (188–190). En la región extracelular de ambas subunidades existen dominios de fibronectina tipo III, característicos de la superfamilia de receptores de clase I. En el caso de IL-5RA, estos dominios forman parte del motivo de reconocimiento de citocinas y se ha descrito en ellos la existencia de grupos de residuos

específicos relacionados con la unión de la IL-5, lo cual sugiere la posibilidad de adaptar moléculas específicas con fines terapéuticos (166,191). Además, en la región citoplasmática proximal a la membrana, ambas subunidades tienen un motivo conservado denominado PPXP, con secuencias ricas en prolina, que va a favorecer la unión a moléculas de señalización (192).

El gen que codifica la subunidad alfa, objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 y contiene catorce exones (*IL5RA*; 3p24-26) (193), mientras que el gen que codifica la subunidad beta se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 (*CSF2RB*; 22q12.3-13.1) (194).

Se ha sugerido que los eosinófilos son capaces de controlar su respuesta a IL-5 regulando la expresión de las diferentes isoformas de IL-5RA, aunque el mecanismo de modulación aún no está bien definido. Algunos estudios *in vitro* indican que, en respuesta a la estimulación de citocinas, se produce una modificación transcripcional mediante *splicing* alternativo que da lugar a una forma activa anclada a la membrana y una forma soluble con propiedades antagónicas (195,196). Asimismo, otros autores proponen como principal mecanismo de generación de la variante soluble de IL-5RA la escisión proteolítica del receptor de superficie (197). No obstante, se requieren estudios *in vivo* más detallados.

b) Transducción de señales

La interacción de la IL-5 con el receptor IL-5R provoca cambios conformacionales dinámicos en los sitios de unión de ambas moléculas. Estos cambios tienen lugar en dos fases, ya que primero sucede la unión de la IL-5 a la subunidad alfa y después este complejo se une a la subunidad beta para iniciar la transducción de señales (198). La señalización específica desencadenada por esta interacción interleucina-receptor es diversa y compleja (Figura 12). Comienza con la rápida fosforilación de una tirosina en el extremo citoplasmático del receptor, que va a inducir la formación de fosfotirosinas en varias moléculas de señalización intracelular, como las proteínas quinasas Janus (JAK), las proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STAT), las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y

las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La fosforilación de estas proteínas da lugar a la activación de moléculas de señalización descendentes. Así, se origina la activación de diferentes vías de transducción de señales intracelulares, como la vía JAK/STAT y la vía Ras/MAPK, que finalmente producen un aumento de la expresión génica de factores de transcripción nucleares, como c-myc, c-fos, c-jun o pim-1, favoreciendo la activación, proliferación y supervivencia celular (190,199). Concretamente, se ha sugerido que las quinasas JAK2, Lyn y Raf-1 son esenciales para la inhibición de la apoptosis, estando Raf-1 implicada también en la desgranulación celular (200). Asimismo, PI3K se ha relacionado con la adhesión celular (201), la quinasa Btk con la estimulación de las células B (175) y las quinasas p38 y ERK1/2 con la diferenciación de los eosinófilos y la producción de citocinas (202).

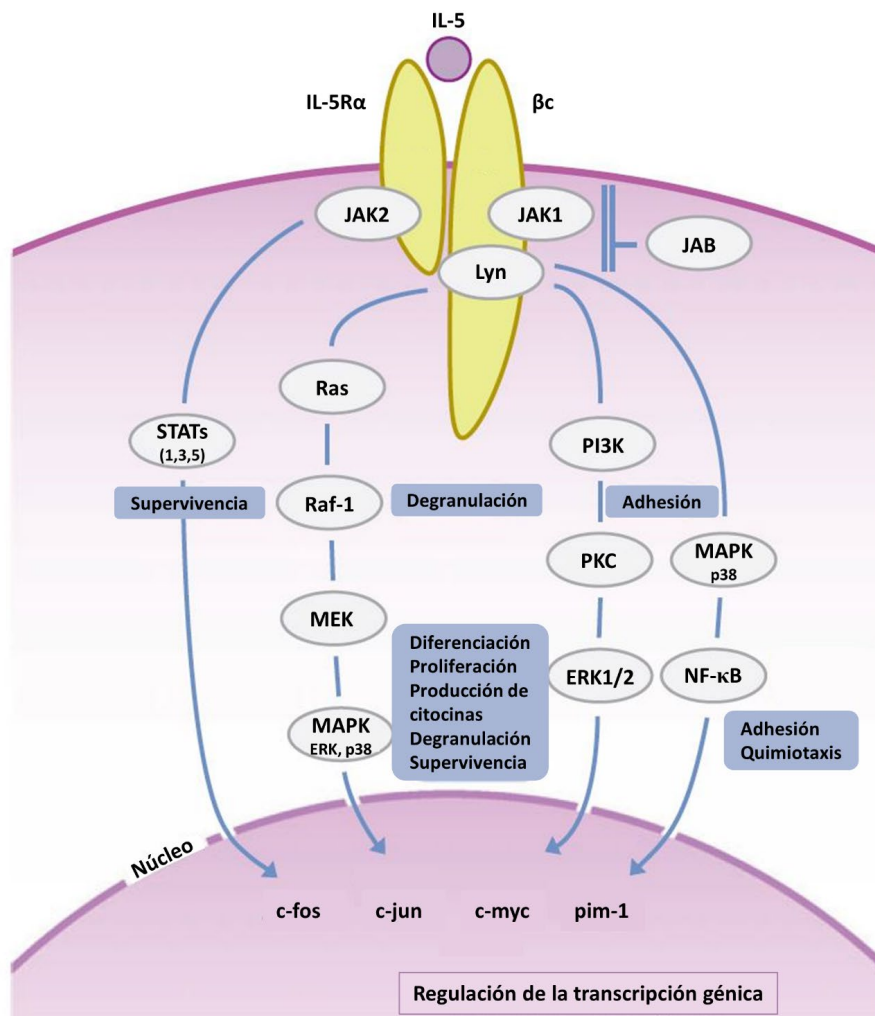


Figura 12. Vías de señalización activadas y procesos biológicos implicados debido a la interacción de la interleucina 5 con el receptor IL-5R. Adaptada de (131).

1.3.3. Asociación con el asma

Como se ha mencionado previamente, el asma se caracteriza por la presencia de inflamación en las vías respiratorias causada por la acumulación de células efectoras, que van a secretar diferentes moléculas mediadoras. Entre estas moléculas destaca la IL-5, debido a su importante papel en la función biológica de los eosinófilos, principales células proinflamatorias implicadas en esta patología.

En estudios con pacientes asmáticos se ha descrito una correlación negativa entre los niveles de IL-5 y la apoptosis de eosinófilos en esputo, además de confirmar la liberación autocrina de IL-5 por dichas células. Esto sugiere que la IL-5 favorece la acumulación de los eosinófilos en los pulmones y que ellos mismos son capaces de prevenir su apoptosis al actuar sobre su propio receptor IL-5R (203,204). En cuanto a este receptor, se ha demostrado la presencia de un mayor número de células positivas para la expresión de IL-5RA en biopsias bronquiales de pacientes asmáticos frente a controles, siendo la mayoría de ellas eosinófilos (205). También se ha observado un aumento de células precursoras CD34⁺ IL-5RA⁺ en el esputo de pacientes asmáticos tras la exposición a aeroalérgenos, lo que sugiere que estas células pueden migrar a las vías respiratorias y diferenciarse *in situ* (206).

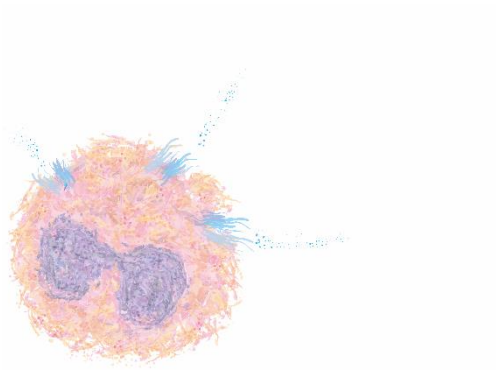
Los modelos animales apoyan el papel de la IL-5 y su receptor en el asma. La importancia de IL-5RA en la inflamación eosinofílica de las vías respiratorias se ha demostrado en ratones con asma inducida por sensibilización a la ovoalbúmina. La pérdida de IL-5RA atenuó el aumento de eosinófilos en el lavado broncoalveolar y la aparición de hiperreactividad bronquial, pero no afectó a la producción de IL-5 ni a los niveles séricos de IgE (207). De la misma manera, el desarrollo de fibrosis subepitelial disminuyó en ratones tratados con anticuerpos monoclonales anti-IL-5, aumentó notablemente en ratones transgénicos para IL-5 y se atenuó en aquellos que presentaban pérdida de IL-5RA (208).

Cabe destacar que el asma eosinofílica es el fenotipo inflamatorio mejor estudiado. En los últimos años, se han desarrollado nuevas terapias basadas en anticuerpos monoclonales dirigidos contra la acción de la IL-5 en la inflamación mediada

Introducción

por eosinófilos. Entre estas terapias destaca benralizumab, debido a que inhibe la señalización de la IL-5 al unirse específicamente a IL-5RA, y ha demostrado su eficacia en el tratamiento de pacientes con asma eosinofílica grave, mejorando la función pulmonar y el control del asma y reduciendo la tasa de exacerbaciones. Si bien es cierto que no todos los pacientes responden igual de bien al tratamiento, por lo que es necesario emplear herramientas de medición adecuadas, así como encontrar biomarcadores que puedan ayudar a seleccionar pacientes y evaluar la respuesta al tratamiento. En resumen, la caracterización y mejora del conocimiento sobre los fenotipos del asma podrían ayudar a estratificar diferentes grupos de pacientes con el objetivo de aplicar estrategias terapéuticas personalizadas para un mejor control de la enfermedad asmática.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

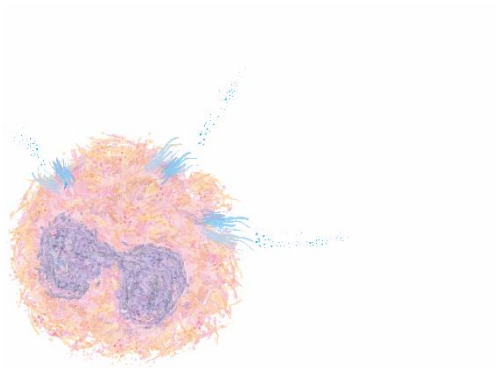
La interleucina 5 desempeña un papel importante en la etiopatogenia del asma y ejerce su función a través de la unión a su receptor, expresado principalmente en la superficie de los eosinófilos. Se han desarrollado nuevas terapias biológicas que actúan contra la subunidad alfa del receptor de la interleucina 5, codificada por el gen *IL5RA*. Por otro lado, no se dispone de biomarcadores adecuados para la selección y la evaluación de los fármacos biológicos en el asma.

Considerando estas premisas, la hipótesis principal sobre la que se asienta este trabajo es que podría existir una asociación entre los niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica y la enfermedad asmática. Además, como hipótesis secundaria se postula que *IL5RA* podría constituir un posible biomarcador de la enfermedad asmática en relación a su implicación en el proceso inflamatorio subyacente, contribuyendo a una mejor caracterización de los pacientes, así como de la respuesta al tratamiento.

Los principales objetivos que se plantean son los siguientes:

1. Analizar la expresión transcriptómica de genes asociados con la patología asmática en sangre periférica.
2. Determinar los niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica en una población de pacientes asmáticos para su posible caracterización como biomarcador de la enfermedad.
3. Estudiar la posible correlación de los niveles de expresión de *IL5RA* y el recuento de eosinófilos en los distintos grupos de pacientes asmáticos.
4. Determinar los niveles de expresión de *IL5RA* antes y después del tratamiento con benralizumab en pacientes con asma eosinofílica grave para su posible caracterización como biomarcador de la respuesta al tratamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio retrospectivo observacional, que se divide en un primer estudio de tipo caso-control, compuesto por un análisis transcriptómico con su posterior validación o análisis de expresión génica, y un estudio farmacogenético en una pequeña población de los individuos analizados previamente.

Todos los participantes recibieron información sobre el estudio y dieron su consentimiento informado para el uso de sus muestras. Se siguieron las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Área de Salud de Salamanca.

3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

En el presente estudio se han analizado un total de 347 individuos no relacionados, 130 controles y 217 pacientes diagnosticados de asma por los facultativos del Servicio de Alergia del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA). Todos ellos cumplieron los criterios de inclusión que se detallan a continuación.

a) Controles

- Edad superior a 16 años.
- Ausencia de síntomas o historia clínica compatible con asma, rinitis u otras enfermedades respiratorias.
- Ausencia de síntomas o historia clínica compatible con enfermedades alérgicas.
- Pruebas cutáneas negativas frente a la batería de aeroalérgenos utilizada.
- Ausencia de antecedentes de asma, rinitis o atopia en familiares de primer grado.

b) Pacientes

- Edad superior a 16 años.
- Presencia de al menos dos síntomas relacionados con la patología asmática.
- Prueba de broncodilatación o prueba de hiperreactividad bronquial con metacolina positiva.
- Ausencia de otras enfermedades respiratorias.

3.2.1. Estudio transcriptómico

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) (PI 2020/02/433). Se incluyeron 60 individuos, 30 controles y 30 pacientes diagnosticados de asma alérgica por sensibilización a pólenes. Se recogió muestra de sangre periférica a cada individuo del estudio.

3.2.2. Estudio de validación

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del IBSAL (PI 2020/02/433). Se incluyeron 287 individuos, 100 controles y 187 pacientes diagnosticados de asma. Se recogió muestra de sangre periférica a cada individuo del estudio.

3.2.3. Estudio farmacogenético

Entre los pacientes analizados en el estudio de validación, se realizó el seguimiento de 11 pacientes diagnosticados de asma eosinofílica grave que comenzaron tratamiento con benralizumab. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para recibir el tratamiento.

La administración de benralizumab se realizó en dosis de 30 mg por vía subcutánea cada cuatro semanas durante las tres primeras dosis y cada ocho semanas a partir de entonces, de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del fármaco. Se

recogió muestra de sangre periférica y se realizó espirometría a cada paciente antes de administrarse la primera dosis de benralizumab y entre la segunda y la quinta dosis del tratamiento.

3.3. VARIABLES

Se recogieron los datos demográficos y las variables clínicas de interés mediante la correspondiente etiqueta identificativa de cada individuo y el formulario de la figura 13. En él se incluyen las pruebas cutáneas frente a distintos alérgenos, el diagnóstico y grado de asma, la presencia de rinitis o poliposis nasosinusal, la hipersensibilidad a los AINE, la existencia de antecedentes familiares de enfermedades alérgicas, la inmunoterapia, el tratamiento con corticoides y los niveles de IgE total.

3.3.1. Datos demográficos

La historia clínica fue elaborada por los facultativos del Servicio de Alergia del CAUSA. Se recogieron datos demográficos como el nombre, los apellidos, la edad, el sexo, la fecha de nacimiento, el número de historia clínica, así como la fecha de la consulta y el facultativo asignado al seguimiento del individuo, todo ello mediante la correspondiente etiqueta identificativa. Todos estos datos, excepto la edad y el sexo, se utilizaron exclusivamente para la identificación inicial de cada individuo y de sus muestras, pero no se reflejaron en ningún otro momento a lo largo del estudio, que se realizó aplicando un sistema de disociación de datos.

REMITIR TUBO (10mL EDTA - tapón morado) Y PETICION AL LABORATORIO DE ALERGIA

Nº LABORATORIO:

Nº SUERO:

FECHA:

DOCTOR:

CONTROL: SI

NO

ESTUDIO: β-Lactámicos

POLIPOSIS

ASMA

OTROS: _____

BIOLÓGICOS: _____

PRUEBAS CUTÁNEAS:

Negativas

Pendientes

Ácaros

Epitelios

Hongos

Pólenes

Alimentos

Otros: _____

NOMBRE y APELLIDOS:

Nº HISTORIA

EDAD

SEXO: V/M

ASMA: NO SI

Intermitente

Persistente Leve

Moderada

Grave

FENO: ppb EOSINÓFILOS:

RINITIS: NO

Intermitente Leve

Moderada

Persistente Grave

EDAD DE APARICIÓN DEL ASMA:.....años

EDAD DE APARICIÓN DE LA RINITIS:.....años

INTOLERANCIA AINES: NO

SI: Respiratoria

Cutánea

POLIPOSIS: SI

NO

ANTECEDENTES FAMILIARES: SI NO

Atopia: 1^{er} grado 2^o grado madre

Asma: 1^{er} grado 2^o grado madre

Rinitis: 1^{er} grado 2^o grado

Poliposis: 1^{er} grado 2^o grado

INMUNOTERAPIA: NO SI (ACTUALMENTE: / EN EL PASADO) ESPECIFICAR:

TRATAMIENTO ACTUAL CON CORTICOIDES: NO SI: ORAL (compuestodosis.....)

INHALADO (compuestodosis.....)

IgE TOTAL:

OBSERVACIONES:

Figura 13. Variables recogidas en el formulario del Servicio de Alergia del CAUSA.

3.3.2. Asma

a) Diagnóstico del asma

El diagnóstico del asma se realizó utilizando los siguientes criterios:

- Al menos dos síntomas relacionados con la patología asmática como tos, disnea, opresión torácica o sibilancias.
- Alteración de la función pulmonar. Se realizó una espirometría basal siguiendo las normas de la *American Thoracic Society (ATS)* (209). A todos los pacientes con $FEV_1/FVC < 70 \%$ se les realizó una prueba de broncodilatación, que se consideró positiva con una mejoría del $FEV_1 \geq 200 \text{ ml}$ y $\geq 12 \%$. Si ésta fue negativa, se amplió con una prueba de hiperreactividad bronquial con metacolina (69), considerando positivo una $PC_{20\text{metacolina}} < 16 \text{ mg/ml}$.
- Ausencia de otras enfermedades respiratorias.

Se consideró que el asma era de inicio precoz cuando la presencia de los síntomas apareció antes de los 18 años, y de inicio tardío o en la edad adulta cuando apareció a partir de los 18 años.

b) Gravedad del asma

La gravedad del asma se clasificó según las categorías establecidas por la GEMA y en condiciones basales, siempre que fuera posible. En aquellos pacientes que estaban recibiendo tratamiento, la gravedad se determinó siguiendo las recomendaciones de la GEMA adaptadas al escalón del tratamiento (2). El asma grave se diagnosticó de acuerdo a los criterios establecidos por la *European Respiratory Society (ERS)* y la *ATS* (91).

Asma intermitente

- Aparición de síntomas con una frecuencia inferior a una vez por semana.
- Crisis de corta duración.
- Síntomas nocturnos con una frecuencia inferior a dos veces al mes.
- FEV_1 o $PEF \geq 80 \%$ del valor teórico.

Material y métodos

- Variabilidad del FEV₁ o PEF < 20 %.

Asma persistente leve

- Aparición de síntomas con una frecuencia superior a una vez por semana, pero no diariamente.
- Episodios nocturnos que se presentan más de dos veces al mes.
- FEV₁ o PEF ≥ 80 % del valor teórico.
- Variabilidad del FEV₁ o PEF entre 20-30 %.

Asma persistente moderada

- Síntomas diarios que pueden afectar a la actividad diaria y al sueño del paciente.
- Uso diario de β₂ agonistas inhalados.
- FEV₁ o PEF entre 60-80 % del valor teórico.
- Variabilidad del FEV₁ o PEF > 30 %.

Asma persistente grave

- Síntomas diarios.
- Crisis frecuentes.
- Episodios asmáticos nocturnos frecuentes.
- Limitación en las actividades físicas.
- FEV₁ o PEF < 60 % del valor teórico.
- Variabilidad del FEV₁ o PEF > 30 %.

3.3.3. Atopia

La presencia de atopia se evaluó mediante pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata, siguiendo las recomendaciones para la normalización de alérgenos y pruebas cutáneas de la *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI) (210). Estas pruebas consisten en realizar una punción perpendicular a la epidermis con una gota del extracto alérgico a estudio, mediante una lanceta con una punta estandarizada de 1 mm. Se consideró que el resultado era positivo cuando se generaba

una pápula igual o superior a 3 mm de diámetro, siempre que el control negativo no presentase reacción. Antes de realizar la prueba, se retiraron los antihistamínicos y otros fármacos que pudiesen interferir con el resultado, siguiendo las indicaciones de la EAACI (210).

Se utilizó una batería estandarizada de alérgenos comunes en nuestro entorno (ALK-Abelló, Madrid; Bial-Aristegui, Bilbao; CBF-Leti, Barcelona), una solución de histamina 10 mg/ml como control positivo y una solución salina como control negativo. La batería incluía los siguientes aeroalérgenos, incluidos en cuatro grupos:

- Ácaros: *Dermatophagoides pteronissynuss*, *Dermatophagoides farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* y *Acarus siro*.
- Pólenes de gramíneas, malezas y árboles: *Cynodon dactylon*, *Phleum pratense*, *Parietaria judaica*, *Chenopodium álbum*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Olea europaea*, *Cupressus arizonica*, *Platanus hispanicus* y *Quercus ilex*.
- Hongos: *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum* y *Aspergillus fumigatus*.
- Epitelios: *Canis lupus*, *Felis domesticus*, *Mesocricetus auratus*, *Equus ferus caballus* y *Oryctolagus cuniculus*.

El paciente se consideró atópico cuando las pruebas cutáneas fueron positivas frente al menos uno de los alérgenos de la batería. Según los resultados y en función de los grupos establecidos de alérgenos, los pacientes se clasificaron como monosensibilizados, si presentaban pruebas cutáneas positivas frente a un solo grupo, o polisensibilizados, frente a dos o más grupos. Además, se diagnosticó alergia en aquellos casos en los que existía una prueba cutánea positiva junto a manifestaciones clínicas relacionadas con la exposición a un alérgeno determinado.

3.3.4. Poliposis nasosinusal

El diagnóstico de poliposis nasosinusal fue realizado por los facultativos del Servicio de Otorrinolaringología del CAUSA, basándose en la historia clínica y los

hallazgos en la exploración de la cavidad nasal. Se utilizaron los siguientes criterios (211,212):

- Presencia durante más de 12 semanas de al menos dos síntomas principales, uno de los cuales debe ser o bien obstrucción/congestión nasal o bien rinorrea anterior o posterior. También puede haber pérdida del olfato y dolor o presión facial.
- Visualización de pólipos bilaterales en el meato medio de la cavidad nasal, observados mediante endoscopia nasal, o bien cambios en la mucosa del complejo ostiomeatal o de los senos paranasales, observados mediante TAC.

3.3.5. Parámetros clínicos

Determinación de IgE

La determinación de los niveles de IgE total constituye actualmente una técnica de rutina en los laboratorios de diagnóstico alergológico. En este estudio se realizó una extracción de sangre periférica a todos los participantes y se determinaron los niveles de IgE total en suero mediante la técnica de enzimoanálisis de tipo sándwich en un analizador *Phadia ImmunoCAP 250* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.).

Esta técnica consiste en la unión de las IgE del suero a los anticuerpos anti-IgE que están unidos covalentemente a los pocillos. En un segundo paso, se añaden anticuerpos anti-IgE marcados enzimáticamente con β -galactosidasa (anticuerpos monoclonales de ratón, 1 $\mu\text{g/ml}$), formándose así un inmunocomplejo de tipo sándwich. Tras la incubación, se realiza una serie de lavados para eliminar el exceso de enzima y se incuba con la solución que contiene el sustrato (Figura 14). Finalmente, se detiene la reacción y se mide la fluorescencia obtenida, que será directamente proporcional a la concentración de IgE total. Para el análisis de resultados es necesaria la realización de una curva patrón.

En función de los resultados de las pruebas cutáneas, en aquellos pacientes en los que no fueron concluyentes se realizó una determinación de IgE específica en un analizador *Phadia ImmunoCAP 250* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.).

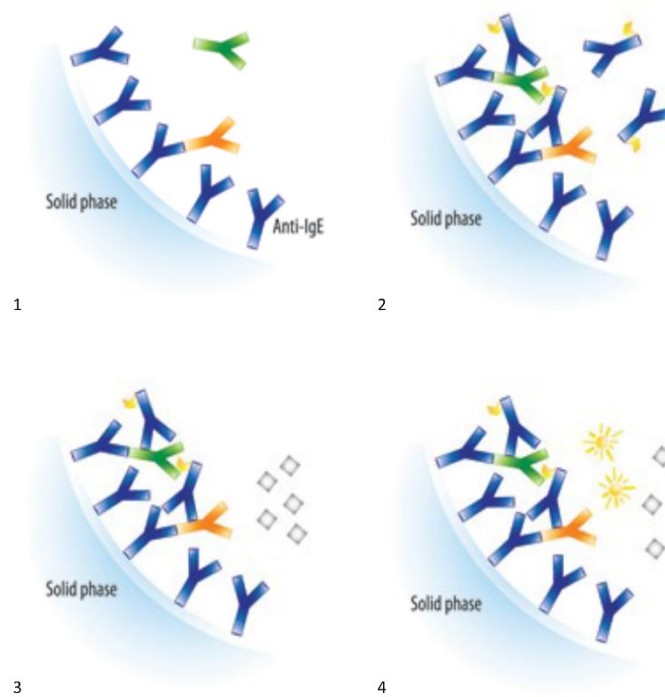


Figura 14. Enzoinmunoanálisis para la determinación de IgE total.

Recuento de eosinófilos

A todos los participantes del estudio se les realizó una extracción de sangre periférica, en un tubo con EDTA como anticoagulante, para la determinación del hemograma en un analizador hematológico XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japón). Se recogieron los datos de los diferentes parámetros del hemograma de cada individuo, entre los que se encuentra el recuento absoluto de eosinófilos.

Se clasificó a los pacientes en función de si tenían asma eosinofílica o no eosinofílica, utilizando como punto de corte un recuento de eosinófilos absolutos en sangre periférica de 150/ μ l (3).

Fracción exhalada de óxido nítrico

Para su determinación se utilizó un monitor NIOX VERO (Aerocrine, Solna, Suecia) y se siguieron las recomendaciones de la ATS y la ERS (71). El procedimiento consiste en realizar una inhalación máxima a través de la boquilla del aparato, seguida de una exhalación de 10 segundos de duración. La concentración de NO se expresa en partes por mil millones (ppb). La interpretación de los resultados debe hacerse en función de cada individuo y del contexto en el que hayan sido obtenidos. Se utilizaron los valores de referencia propuestos por la ATS (213), considerándose:

- FeNO < 25 ppb: bajo.
- FeNO 25-50 ppb: debe interpretarse en función del contexto clínico.
- FeNO > 50 ppb: alto.

Pruebas de función pulmonar

Se realizó una espirometría forzada a los pacientes del estudio farmacogenético según los criterios de la ATS (209). Esta técnica mide el flujo y volumen de aire en los pulmones, por lo que ayuda a la evaluación de la función pulmonar y es útil para el diagnóstico del asma.

La espirometría fue realizada por personal cualificado y en un ambiente tranquilo. Previamente se valoró si existía alguna contraindicación para su realización y se explicó a los pacientes las maniobras a realizar. Se utilizaron dos espirómetros, DATOSPIR-600 (Sibelmed-SIBEL SA, Barcelona) y MasterScope (CareFusion, Hoechberg, Alemania), que se calibraron al comenzar según las condiciones meteorológicas del día (presión atmosférica, humedad relativa y temperatura).

Se utilizó el FEV₁ para valorar la función pulmonar de los pacientes en tratamiento con benralizumab en el estudio farmacogenético, considerando buenos respondedores a aquellos que presentasen un aumento del FEV₁ ≥ 200 ml y ≥ 12 % tras varias dosis de tratamiento.

Test de control del asma

El ACT (90) consiste en un cuestionario con cinco preguntas relacionadas con la frecuencia de los síntomas y el uso de tratamientos de rescate en un periodo de tiempo determinado (Figura 15). El paciente cumplimenta el cuestionario puntuando cada pregunta del 1 al 5, por lo que el rango de puntuación varía entre 5 y 25 puntos. Sirve para evaluar el grado de control del asma según los siguientes intervalos (3):

- ACT entre 5-15 puntos: asma no controlada.
- ACT entre 16-19 puntos: asma parcialmente controlada.
- ACT entre 20-25 puntos: asma controlada.

Se utilizó el ACT para valorar a los pacientes en tratamiento con benralizumab en el estudio farmacogenético, considerando buenos respondedores a aquellos con un ACT \geq 20 puntos o con un incremento de 3 o más puntos tras varias dosis de tratamiento.

Respuesta a benralizumab

En el estudio farmacogenético, se utilizaron dos herramientas diferentes para evaluar la respuesta de los pacientes al tratamiento con benralizumab e intentar clasificarlos en función de si eran o no superrespondedores.

En primer lugar, se utilizó el estudio Delphi, en el que se ha desarrollado una definición consensuada de paciente superrespondedor al tratamiento con biológicos mediante la creación de una serie de criterios (110). Además, se ha establecido que deben cumplirse tres o más criterios, de los cuales al menos dos deben ser criterios mayores, y que deben estar presentes durante doce meses.

Criterios mayores

- Eliminación de las exacerbaciones.
- Importante mejora del control del asma.
- Eliminación de los glucocorticoides orales.

Criterios menores

- Reducción de las exacerbaciones un 75 %.
- Lograr un buen control del asma.
- Mejora del FEV₁ ≥ 500 ml.

Por otro lado, se utilizó el índice FEOS, que se basa en asignar una puntuación a cada paciente en función de cuatro aspectos relevantes de su estado clínico tras el tratamiento, como son el FEV₁, las exacerbaciones, los glucocorticoides orales y los síntomas (111). De esta manera, cuanto mayor sea la puntuación obtenida, mayor será la respuesta al tratamiento. Para valorar correctamente esta puntuación hay que tener en cuenta la duración del tratamiento, ya que un periodo inferior a seis meses es demasiado corto para evaluar la influencia del biológico en las exacerbaciones y la retirada de los glucocorticoides orales. Además, para realizar una comparación entre los diferentes pacientes, es necesario normalizar la puntuación obtenida respecto a la máxima mejoría posible en cada caso.

Fecha de hoy: _____

Nombre y apellido del paciente: _____

PARA LOS PACIENTES:

Tome la Prueba de Control del Asma (Asthma Control Test™ – ACT) para personas de 12 años de edad en adelante.

Averigüe su puntaje. Comparta sus resultados con su médico.

Paso 1 Anote el número correspondiente a cada respuesta en el cuadro de la derecha.

Paso 2 Sume todos los puntos en los cuadros para obtener el total.

Paso 3 Llévele la prueba a su doctor para hablar sobre su puntaje total.

1. En las últimas 4 semanas, ¿cuánto tiempo le ha impedido su asma hacer todo lo que quería en el trabajo, en la escuela o en la casa?						PUNTAJE <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> TOTAL <input type="text"/>				
Siempre	1	La mayoría del tiempo	2	Algo del tiempo	3		Un poco del tiempo	4	Nunca	5
2. Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia le ha faltado aire?										
Más de una vez al día	1	Una vez por día	2	De 3 a 6 veces por semana	3		Una o dos veces por semana	4	Nunca	5
3. Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia sus síntomas del asma (respiración sibilante o un silbido en el pecho, tos, falta de aire, opresión en el pecho o dolor) lo/la despertaron durante la noche o más temprano de lo usual en la mañana?										
4 o más noches por semana	1	2 ó 3 veces por semana	2	Una vez por semana	3	Una o dos veces	4	Nunca	5	
4. Durante las últimas 4 semanas, ¿con qué frecuencia ha usado su inhalador de rescate o medicamento en nebulizador (como albuterol)?										
3 o más veces al día	1	1 ó 2 veces al día	2	2 ó 3 veces por semana	3	Una vez por semana o menos	4	Nunca	5	
5. ¿Cómo evaluaría el control de su asma durante las últimas 4 semanas?										
No controlada, en absoluto	1	Mal controlada	2	Algo controlada	3	Bien controlada	4	Completamente controlada	5	
<small>Derechos de autor 2002, por QualityMetric Incorporated Asthma Control Test es una marca comercial de QualityMetric Incorporated.</small>										

Si obtuvo 19 puntos o menos, es posible que su asma no esté tan bien controlada como podría. Hable con su médico.

PARA LOS MÉDICOS:

La Prueba ACT:

- Ha sido convalidada clínicamente por espirometría y evaluaciones de especialistas¹
- Tiene el apoyo de la American Lung Association (Asociación Americana del Pulmón)
- Consiste en un breve cuestionario de 5 preguntas al que el paciente responde independientemente y que puede ayudarle al médico a evaluar el asma de sus pacientes durante las últimas 4 semanas.

Referencia: 1. Nathan RA et al. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:59-65.

Prueba del control del asma es una marca registrada y marca de QualityMetric Incorporated, 2002.

05081-026 (Revised 9-08) Asthma Control Test - Regional Health Education

Adapted with permission of QualityMetric, Inc.

Figura 15. Cuestionario realizado a los pacientes en el ACT.

3.4. ANÁLISIS MOLECULAR

3.4.1. Análisis transcriptómico

a) Extracción de ARN

La extracción de ARN para secuenciación masiva se realizó mediante el kit comercial Ambion *RiboPureTM-Blood Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), utilizando el protocolo alternativo que incluye algunas modificaciones para aislar ARN total incluyendo transcritos pequeños. Las muestras de sangre periférica se recogieron en tubos con anticoagulante EDTA y se alicuotaron mezclándose con el conservante *RNAlater[®] solution* (1.300 µl por cada 450 µl de sangre). Este reactivo se utiliza para desactivar ARNasas y conservar el ARN de las muestras a -20 °C hasta su procesamiento.

Previamente a la extracción, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13 200 rpm durante 1 minuto. Tras la eliminación del sobrenadante, se añadieron 800 µl de solución de lisis y 10 µl de ácido acético y se agitó mediante vórtex durante 2 minutos para conseguir la lisis celular. Después se mantuvo en hielo durante 5 minutos.

La purificación inicial del ARN se realizó mediante una extracción con 500 µl de fenol:cloroformo (proporción 24:1). Inmediatamente después de agitar mediante vórtex durante 1 minuto, se centrifugó la muestra durante 1 minuto y se transfirió la fase acuosa o sobrenadante (1-1,2 ml) a un tubo nuevo. Después, se añadió 1 ml de solución de desnaturalización, se agitó mediante vórtex durante 1 minuto, se añadieron 2,7 ml de etanol 100 % y se mezcló por inversión. De esta manera se consiguen separar los ácidos nucleicos del resto de componentes celulares.

Para la purificación final del ARN se pasó la muestra a través del filtro de una columna de afinidad en un tubo colector, pasando 700 µl cada vez. Se centrifugó durante 1 minuto y se descartó el eluido. Después, se realizó el lavado de la columna repitiendo el paso anterior con las soluciones de lavado, primero con 700 µl de la solución de

lavado 1 (70 % etanol y 30 % solución de desnaturalización) y luego dos veces con 700 μ l de la solución de lavado 2 (80 % etanol y 50 mM NaCl). Tras el último lavado, se centrifugó durante 1 minuto y se colocó la columna en un nuevo tubo. Finalmente, para obtener el ARN se añadieron sobre el filtro 150 μ l de solución de elución (precalentada a 80 °C), se dejó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto, recuperando el ARN en el tubo colector.

El último paso consistió en un tratamiento enzimático para eliminar el ADN genómico que quede en la muestra. Para ello, se añadieron al eluido 9 μ l de una solución con ADNasa (7,5 μ l de buffer y 1,5 μ l de *DNAsa I*) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se añadieron 30 μ l de la resina de inactivación de ADNasas, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 minuto para precipitar la resina. El sobrenadante que contiene el ARN purificado se transfirió a un nuevo tubo y supuso un volumen final de aproximadamente 150 μ l.

b) Cuantificación de ARN

La cuantificación del ARN obtenido se realizó mediante el espectrofotómetro *NanoDrop™ ND-1000* (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.), utilizando una longitud de onda de 260 nm. La calidad del ARN se comprobó mediante el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer* y el kit *Eukaryote Total RNA Nano* (Agilent Technologies, CA, EE.UU.). Este equipo proporciona un análisis de la integridad del ARN o RIN (*RNA Integrity Number*), considerándose un ARN de buena calidad si tiene un RIN > 8 (Figura 16). Este procedimiento se realizó antes y después de concentrar el ARN.

c) Concentración de ARN

Para concentrar y purificar el ARN obtenido se utilizó el kit comercial *RNeasy MinElute Cleanup Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). Inicialmente, se añadió agua libre de ARNasas hasta llegar a un volumen de 200 μ l y, tras añadir 350 μ l de buffer RLT, se agitó mediante vórtex durante 1 minuto. Después, se añadieron 950 μ l de etanol 96-100 %, se mezcló por inversión y se pasó la muestra a través de la membrana de una columna de afinidad en un tubo colector, pasando 700 μ l cada vez. Se centrifugó a 10 000 rpm

Material y métodos

durante 30 segundos, se descartó el eluido y se repitió el proceso con el resto de muestra.

Para realizar el lavado de la columna, se colocó en un nuevo tubo colector, se añadieron 500 µl de buffer RPE con etanol y se centrifugó durante 30 segundos. Tras descartar el eluido, se añadieron 500 µl de etanol 80 % y se centrifugó durante 2 minutos. A continuación, se colocó la columna en un nuevo tubo colector y, con la tapa abierta, se centrifugó a 13 200 rpm durante 5 minutos para eliminar restos de etanol.

Por último, se volvió a colocar la columna en un nuevo tubo colector, se añadieron 14 µl de agua libre de ARNasas sobre el centro de la membrana y se centrifugó durante 1 minuto para eluir el ARN. El volumen de ARN eluido final fue de 12 µl.

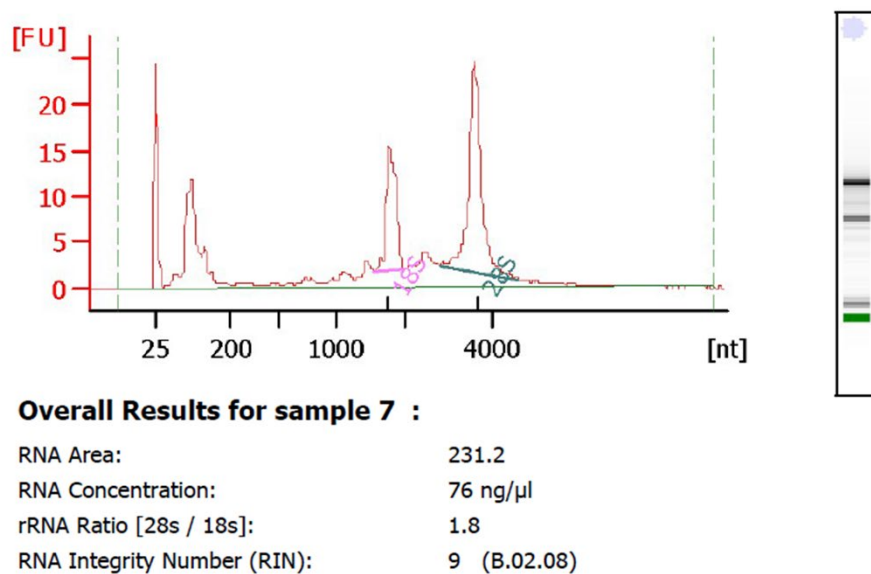


Figura 16. Ejemplo de gráfica obtenida en el análisis de calidad del ARN mediante el equipo Agilent 2100 Bioanalyzed.

d) Preparación de librerías y ultrasecuenciación

Se eliminaron los transcritos de globina y el ARN ribosómico, y se escindió el ARN para la preparación de librerías de ARN de cadena específica a partir del ARN total, obteniendo dos librerías correspondientes al grupo de controles y grupo de pacientes. La generación de *clusters* de cada librería y su posterior secuenciación masiva se llevó a

cabo en el sistema de secuenciación de alto rendimiento *Illumina HiSeq 2500* (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) del laboratorio de Sistemas Genómicos de Paterna (Valencia).

e) Análisis bioinformático

Análisis de expresión diferencial

Una vez obtenidos los datos brutos de secuenciación, el procedimiento de análisis bioinformático se inició con el control de calidad de los mismos, realizado con el *software FastQC* (214). Mediante esta herramienta se comprueba la calidad de las secuencias, la distribución de las lecturas y, además, aporta información sobre parámetros como el contenido de bases G/C, la presencia y calidad de *kmeros* o si hay secuencias que se encuentren muy representadas. Las lecturas de baja calidad, que pueden introducir errores en el análisis, se eliminaron mediante herramientas bioinformáticas de manejo de secuencias como *Picard* (215).

A continuación, se realizó el alineamiento de las lecturas generadas frente al genoma humano de referencia (GRCh38) mediante búsqueda por homología. Para ello, se utilizaron diferentes *software* bioinformáticos especializados en el mapeo de lecturas que tienen en cuenta las uniones de empalme entre exones, como el algoritmo *TopHat2* (216). Las lecturas no mapeadas o emparejadas incorrectamente durante el procesamiento inicial fueron remapeadas usando el algoritmo *BWA-MEM* (217).

Tras el alineamiento, se utilizó el paquete de herramientas *Cufflinks* (218) para realizar un ensamblado de las secuencias con el objetivo de identificar los distintos transcritos presentes en las muestras. Después, se calcularon los niveles de expresión por gen, para lo cual se utilizó el programa *HTSeq-count* (219) que proporciona el recuento bruto por gen.

Por último, la normalización y el análisis de expresión diferencial se llevó a cabo mediante el paquete *DESeq2* (220). El criterio que se utilizó en la selección de los transcritos con expresión diferencial fue la presencia de un valor absoluto de *fold change* mayor a 1,5 y una significación estadística ajustada (P_{adj} -valor) menor a 0,05. El ajuste

del *P*-valor para test múltiples se realizó mediante el método de Benjamini-Hochberg según el FDR (*false discovery rate*) (221).

Análisis de enriquecimiento ontológico

A continuación, se realizó un análisis de enriquecimiento ontológico con el objetivo de obtener una interpretación biológica de los transcritos seleccionados, identificando los procesos biológicos en los que intervienen. Para ello, se agruparon según la similitud de términos GO (*Gene Ontology*) relacionados con los procesos biológicos, su función molecular y su localización en componentes celulares, utilizando las herramientas *ToppFun (ToppGene Suite)* (222) y *Clusterprofile* (223).

Para complementar el análisis, se examinaron las interacciones proteicas entre las proteínas codificadas por los transcritos seleccionados. Para ello, se utilizó el método de agrupación *K-means* del software *STRING* (224,225), que genera un mapa de asociaciones funcionales y físicas entre proteínas conocidas. Además, se utilizaron las bases de datos *KEGG* (226) y *Reactome* (227) para determinar las vías biológicas relacionadas con los transcritos seleccionados.

3.4.2. Análisis de expresión génica

a) Guía MIQE

La guía MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (228) es una revisión que incluye un conjunto de directrices que describen la información mínima necesaria para realizar y publicar experimentos de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa (qPCR). Todos los experimentos descritos en este trabajo se ajustan a las reglas y especificaciones para su correcta interpretación y para considerar los resultados de calidad suficiente para ser publicados.

b) Extracción de ARN

Para su realización se utilizó el kit comercial Ambion *RiboPureTM-Blood Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las muestras de sangre periférica se recogieron en tubos con anticoagulante EDTA y se alicuotaron mezclándose con el conservante *RNAlater[®] solution* (1300 µl por cada 450 µl de sangre). Este reactivo se utiliza para desactivar ARNasas y conservar el ARN de las muestras a -20 °C hasta su procesamiento.

Previamente a la extracción, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13 200 rpm durante 1 minuto. Tras la eliminación del sobrenadante, se añadieron 800 µl de solución de lisis y 50 µl de acetato sódico y se agitó mediante vórtex durante 2 minutos para conseguir la lisis celular.

La purificación inicial del ARN se realizó mediante una extracción con 500 µl de fenol:cloroformo (proporción 24:1). Tras agitar mediante vórtex durante 1 minuto e incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó la muestra durante 1 minuto y se transfirió la fase acuosa o sobrenadante (1-1,2 ml) a un tubo nuevo. Después, se añadió la mitad de volumen (600 µl) de etanol 100 % y se mezcló por inversión.

Para la purificación final del ARN se pasó la muestra a través de la membrana de una columna de afinidad en un tubo colector, pasando 700 µl cada vez. Se centrifugó durante 1 minuto y se descartó el eluido. Después, se realizó el lavado de la columna repitiendo el paso anterior con las soluciones de lavado, primero con 700 µl de la solución de lavado 1 y luego dos veces con 700 µl de la solución de lavado 2/3. Tras el último lavado, se centrifugó durante 1 minuto y se colocó la columna en un nuevo tubo. Finalmente, para obtener el ARN se añadieron sobre el filtro 50 µl de solución de elución (precalentada a 75 °C), se centrifugó durante 1 minuto y se volvió a pasar el eluido por el filtro repitiendo el paso anterior, recuperando el ARN en el tubo colector.

El último paso consistió en un tratamiento enzimático para eliminar el ADN genómico que quede en la muestra. Para ello, se añadieron al eluido 3,5 µl de una solución con ADNasa (2,5 µl de buffer y 1 µl de *DNAsa I*) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se añadieron 10 µl de la resina de inactivación de ADNasas, se

Material y métodos

incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 minuto para precipitar la resina. El sobrenadante que contiene el ARN purificado se transfirió a un nuevo tubo.

c) Cuantificación de ARN

La cuantificación del ARN se realizó mediante el espectrofotómetro *NanoDrop™ ND-1000* (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.) utilizando una longitud de onda de 260 nm (Figura 17). La calidad del ARN se comprobó mediante el ratio 260/280 nm que debe tener valores cercanos a 2,0 para indicar la ausencia de proteínas y el ratio 260/230 nm entre 2,0-2,2 indicaría la ausencia de contaminación por restos de fenol (229).

d) Concentración de ARN

Se calculó el volumen necesario para obtener una cantidad de 500 ng de ARN/muestra. Puesto que para el proceso de retrotranscripción el volumen máximo debe ser 8 µl, aquellas muestras cuyo volumen resultó superior tuvieron que someterse a un proceso de concentración. Para ello, se utilizó el equipo *Eppendorf Concentrator plus* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) que se basa en la generación de vacío de manera delicada, eficiente y rápida.

e) Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la retrotranscripción de ARN se utilizó el kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Este sistema detecta moléculas de tamaño entre 100 pb-12 kb y puede partir de una cantidad de ARN total entre 1 pg-50 µg. La enzima *SuperScript® III RT* es capaz de transcribir ARN en ADNc en un intervalo de temperatura entre 42-55 °C con una elevada especificidad y no se inhibe por la presencia de ARN ribosomal ni transferente.

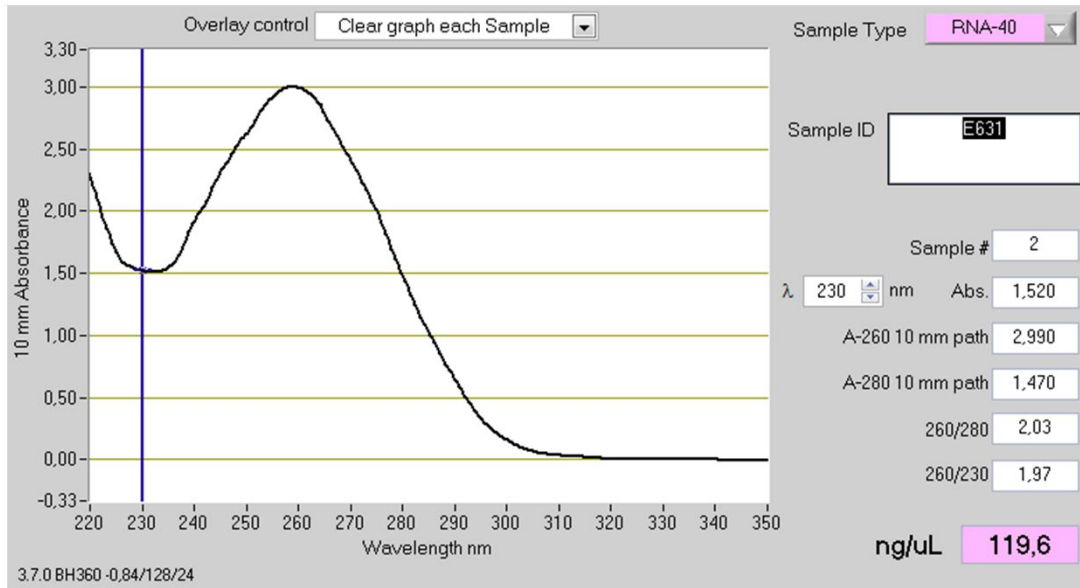


Figura 17. Ejemplo de gráfica obtenida en la cuantificación y análisis de calidad del ARN mediante el equipo Nanodrop™ ND-1000.

Como indica el procedimiento del fabricante, el primer paso fue la desnaturalización del ARN junto a una mezcla de dNTP (10 mM) y hexámeros aleatorios (50 ng/μl), incubando a una temperatura de 65 °C durante 5 minutos. Después, manteniendo las muestras en hielo, se añadió la mezcla de síntesis de ADNc formada por Buffer RT (10X), MgCl₂ (25 mM), DTT (0,1 M), *RNaseOUT™* (40 U/μl) y *SuperScript® III RT* (200 U/μl). La solución resultante se sometió a tres pasos: anillamiento a 25 °C durante 10 minutos, elongación a 50 °C durante 50 minutos e inactivación de la reacción a 85 °C durante 5 minutos. Por último, se incubó con *RNasa H* (2 U/μl) a 37 °C durante 20 minutos para eliminar la hebra de ARN molde y aumentar así la sensibilidad. Todo el proceso se realizó en el termociclador *Multigene optimax* (LabNet biotécnica SL, Madrid, España).

La concentración final de ADNc se calculó dividiendo la cantidad inicial de ARN entre el volumen final obtenido tras la retrotranscripción. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

$$\text{Concentración ADNc (ng/}\mu\text{l)} = \frac{500 \text{ ng ARN}}{20 \mu\text{l}} = 25 \text{ ng/}\mu\text{l ADNc}$$

f) PCR cuantitativa

En cada experimento de qPCR se incluyeron muestras de controles, muestras de pacientes, controles negativos y un calibrador, que consiste en una muestra de ADNc de concentración conocida y sirve como control interensayo. Además, cada situación experimental se realizó por triplicado.

Para la distribución de los reactivos y las muestras se utilizó el equipo *epMotion*[®] 5070 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y para el diseño de la placa de 96 pocillos el programa *epBlue ID™ Version 10.000*. La mezcla de reacción en cada pocillo contenía 7,5 µl de *Master Mix SYBR Green I (2X)* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EE.UU.), 1,2 µl de los cebadores correspondientes (5 µM cada cebador), 5 µl de la solución de ADNc (20 ng) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de reacción de 15 µl.

Para la amplificación del ADNc se utilizó el equipo *LightCycler*[®] 480 System II (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EE.UU.), empleando como fluoróforo *SYBR Green I* mediante el programa *SYBR Green I 96-II* que se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Programa de amplificación SYBR Green I 96-II utilizado en la qPCR.

Programa	Temperatura	Tiempo	Rampa T ^a	
Activación Taq Polimerasa	95°C	10 min	4,4°C/s	
Amplificación				
Desnaturalización	95°C	10 s	4,4°C/s	
Anillamiento	60°C	10 s	2,2°C/s	45 ciclos
Polimerización	72°C	10 s	4,4°C/s	
<i>Melting curve</i>	97°C		0,11°C/s	
Enfriamiento	40°C	30 s	2,2°C/s	

Diseño y estudio de eficiencia de los cebadores

Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la tabla 3 y se diseñaron mediante el software *Primer3* (versión 0.4.0) (230). Se partió de las secuencias de sus genes específicos, que se encuentran en la base de datos *USCS Genome*

Browser (231), y se diseñaron en las uniones entre exones para evitar la amplificación de ADN genómico. Además, para que la amplificación funcione correctamente, los cebadores deben unirse específicamente a la secuencia de interés. Por ello, mediante el software *Beacon Designer* (232), se analizaron determinadas propiedades como la temperatura de anillamiento, el contenido en bases GC y la ausencia de dímeros y otras estructuras secundarias que pueden interferir en su estabilidad.

Todos los cebadores fueron suministrados por *Integrated DNA Technologies* (IDT, Coralville, IA, EE.UU.), en forma de liofilizado, se reconstituyeron con agua libre de nucleasas y se almacenaron a -20 °C.

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para la qPCR.

	Cebador	Secuencia (5' → 3')
IL5RA	<i>Forward</i>	TGAAAGAGTGAAGAACCGCC
	<i>Reverse</i>	CCTGGCCTGAGAAATGCG
GAPDH	<i>Forward</i>	CTCTGCTCCTCCTGTTGAC
	<i>Reverse</i>	ACGACCAAATCCGTTGACTC
TBP	<i>Forward</i>	GAACATCATGGATCAGAACAACA
	<i>Reverse</i>	ATAGGGATTCCGGGAGTCAT

Para realizar el estudio de eficiencia de amplificación de los cebadores se utilizaron diluciones seriadas, entre un rango de 100-0,01 ng, de una muestra de ADNc de concentración conocida. A partir de los valores de Ct (*Threshold Cycle*) obtenidos en la qPCR, se generó la curva estándar en fase logarítmica para cada gen (Figura 18).

La eficiencia de amplificación en porcentaje se calculó mediante la pendiente de la curva estándar, verificando que se situaba entre 100 ± 10 %. Para ello, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) \times 100$$

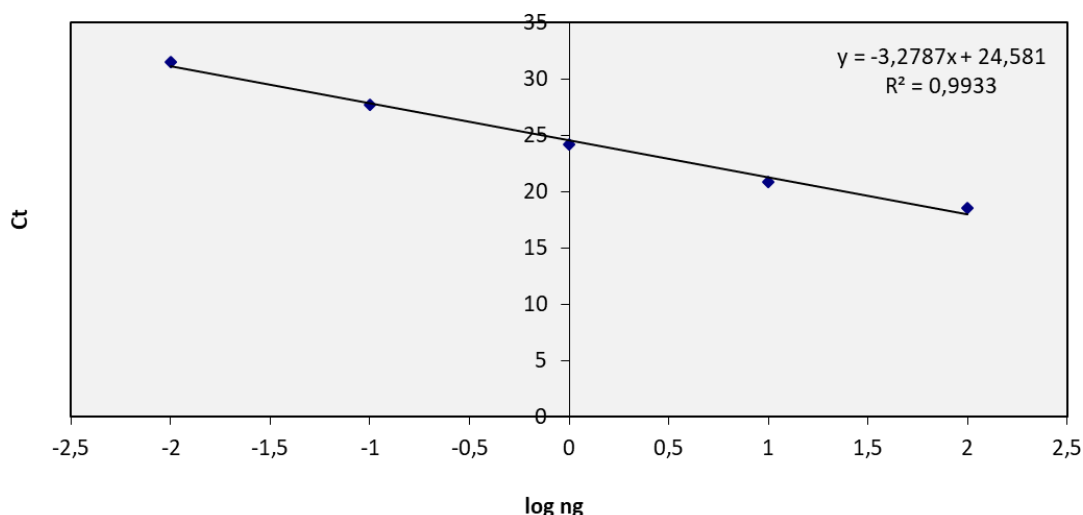


Figura 18. Curva estándar del estudio de eficiencia de los cebadores de GAPDH. Se representa el valor logarítmico del factor de cada dilución frente al valor de Ct de cada dilución.

g) Análisis de expresión

El análisis de expresión se realizó mediante un método de cuantificación relativa denominado método $\Delta\Delta Ct$, que emplea el valor del ciclo umbral Ct y considera la eficiencia del proceso de qPCR máxima e igual para los diferentes genes. Se siguieron las recomendaciones publicadas en el manual *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR* (233).

Los valores de Ct se obtuvieron a partir del análisis de las curvas de amplificación, mediante el software *LigthCycler® 480 Software release Version 1.5.1.62*. Además, también se analizaron las curvas de fusión y se determinaron las temperaturas de fusión (T_m : *melting temperature*) correspondientes a cada gen. De esta manera, se puede detectar la existencia de dímeros de cebador debidos a la inespecificidad del SYBR Green I, que producirían una sobreestimación del grado de expresión génica.

Al ser un método de cuantificación relativa, es necesaria la utilización de un gen de referencia cuyos niveles de expresión deben de ser homogéneos en todas las muestras. De esta manera, se normaliza la cuantificación de la expresión de los genes problema y se evitan las desviaciones generadas por pequeñas variaciones en la cantidad inicial de ADNc en cada reacción. En nuestro caso, se utilizaron dos genes de

referencia ampliamente avalados en la bibliografía, *GAPDH* (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) y *TBP* (TATA-box binding protein).

La reacción de amplificación de cada muestra se realizó por triplicado en pocillos independientes y se calculó la media de los valores de Ct de los tres replicados, comprobando siempre que la desviación estándar no fuese superior a 0,3. A continuación, se comparó primero el valor de Ct del gen problema frente al gen de referencia (ΔCt) y después frente al calibrador ($\Delta\Delta\text{Ct}$), eliminando así la variabilidad interensayo. Para ello, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\Delta\text{Ct muestra} = \text{Ct gen problema} - \text{Ct gen de referencia}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct muestra problema} - \Delta\text{Ct muestra calibrador}$$

Finalmente, para obtener los datos de expresión relativa del gen de interés se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

3.4.3. Análisis farmacogenético

Se analizaron los niveles de expresión de *IL5RA* mediante qPCR, tal y como se ha descrito previamente. Se utilizaron dos condiciones experimentales en cada paciente; antes del tratamiento, para medir las condiciones basales de cada variable, y tras el tratamiento con varias dosis de benralizumab.

El porcentaje de variación en las variables analizadas entre las dos condiciones experimentales se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta (\%) = (\text{Valor final} - \text{Valor inicial} / \text{Valor inicial}) \times 100$$

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.5.1. Análisis descriptivo

El análisis descriptivo de la población estudiada se llevó a cabo mediante el programa estadístico *SPSS versión 21.0* (IBM, Chicago, EE.UU.). Las variables cualitativas fueron descritas en forma de proporciones en los diferentes grupos, mientras que para describir las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central, como la media o la mediana, y medidas de dispersión, como la desviación estándar (DE) o el rango intercuartílico (RI). Previamente, se analizó la distribución de la población para comprobar la normalidad.

3.5.2. Análisis bivalente y multivalente

Se compararon los niveles de expresión de *IL5RA* entre el grupo de controles y los diferentes grupos de pacientes asmáticos mediante un análisis estadístico, con el fin de establecer una posible asociación. Para ello, se utilizó el programa estadístico *SPSS versión 21.0* (IBM, Chicago, EE.UU.). Las pruebas estadísticas que se utilizaron se enumeran a continuación.

- Prueba de Chi-cuadrado (χ^2): se utilizó en el análisis de las variables cualitativas junto al método de Montecarlo.
- Pruebas de Normalidad: se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov, mediante el método MonteCarlo, para estudiar la normalidad de la distribución de un conjunto de datos.
- Prueba de Kruskal-Wallis: método no paramétrico que asume no normalidad en la distribución de los datos y que se utilizó para comparar las medias de más de dos grupos de muestras.
- Prueba de ANOVA: prueba paramétrica utilizada en distribuciones normales para comparar las medias de más de dos grupos de muestras.
- Test de Wilcoxon: método no paramétrico que se utilizó para comparar la media de dos muestras relacionadas.

Las diferencias se establecieron a partir de un nivel de significación $P < 0,05$. En aquellos casos en los que se encontró una asociación significativa, se realizó una regresión logística binaria ajustando para las posibles variables de confusión, como edad y sexo, con el objetivo de descartar la posible influencia de estas variables en la significación encontrada.

3.5.3. Análisis de correlación

Se realizó un análisis de correlación de Spearman entre los niveles de expresión de *IL5RA* y el recuento de eosinófilos de la población en el estudio de validación. En función del coeficiente de Spearman (ρ), se consideró:

- Correlación fuerte: $\rho > 0,80$.
- Correlación moderada: $0,50 \leq \rho \leq 0,80$.
- Correlación débil: $\rho < 0,50$.

3.5.4. Análisis de sensibilidad y especificidad mediante curvas ROC

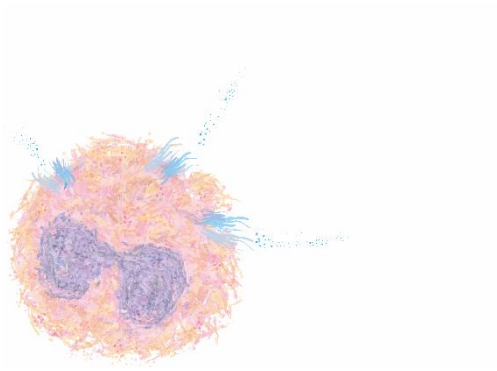
Mediante un análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) se calcularon los puntos de corte que determinaban la sensibilidad y la especificidad óptimas de posibles biomarcadores, como la expresión de *IL5RA* y el recuento de eosinófilos, para su posible aplicación clínica en el diagnóstico del asma. También se realizó dicho análisis combinando ambas variables mediante un modelo de regresión logística, tras comprobar la interacción entre ellas, utilizando el programa estadístico *SPSS versión 21.0* (IBM, Chicago, EE.UU.).

El área bajo la curva (AUC: *Area Under the Curve*) permitió evaluar de manera efectiva el poder de los test para discriminar la condición de los individuos en la población estudiada. La potencia estadística se evaluó mediante el intervalo de confianza al 95 % (IC_{95 %}). Para la interpretación de las curvas ROC, se consideró el criterio de Swets (234):

Material y métodos

- Test con baja exactitud: AUC (0,50-0,69).
- Test útil para algunos propósitos: AUC (0,70-0,89).
- Test con alta exactitud: AUC (0,90-1).

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO

4.1.1. Características de la población a estudio

En este estudio se han analizado un total de 60 individuos, 30 controles y 30 pacientes diagnosticados de asma alérgica por pólenes (Tabla 4). La distribución por sexos fue similar; el sexo femenino supuso el 51,7 % y el sexo masculino el 48,3 % del total de los individuos participantes. Se observó una media de edad significativamente mayor en el grupo de controles (Figura 19). Además, tanto la mediana de los niveles de IgE sérica como la mediana del recuento de eosinófilos fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes, en cambio, no se observaron diferencias significativas en el recuento de neutrófilos.

Tabla 4. Características de la población en el estudio transcriptómico.

	N	Sexo (%)		Edad (años)	IgE (kU/L)	Eosinófilos/ μ l	Neutrófilos/ μ l
		F	M	(Media \pm DE)	(Mediana \pm RI)	(Mediana \pm RI)	(Mediana \pm RI)
Controles	30	46,7	53,3	57 \pm 17	46,7 \pm 87,8	140 \pm 154	3760 \pm 2868
Pacientes	30	56,7	43,3	30 \pm 13	179,0 \pm 239,0	310 \pm 311	3295 \pm 1970
P-valor		0,606		< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,389

DE: desviación estándar; F: femenino; M: masculino; RI: rango intercuartílico.

a) Grupo de controles

En el grupo de controles se incluyeron 30 individuos que fueron caracterizados tras una evaluación clínica por parte de los facultativos del Servicio de Alergia del CAUSA. Todos ellos carecían de síntomas o antecedentes familiares de enfermedades alérgicas o respiratorias y presentaron pruebas cutáneas negativas en la batería de aeroalérgenos locales. La proporción por sexos se desplazó hacia el sexo masculino, que supuso el 53,3 % de los controles frente al 46,7 % correspondiente al sexo femenino. La media de edad fue de 57 años (DE = 17). La mediana de los niveles séricos de IgE fue de 46,7 kU/L

Resultados

(RI = 87,8). Además, la mediana del recuento de eosinófilos fue de $140/\mu\text{l}$ (RI = 154) y la mediana del recuento de neutrófilos fue de $3760/\mu\text{l}$ (RI = 2868).

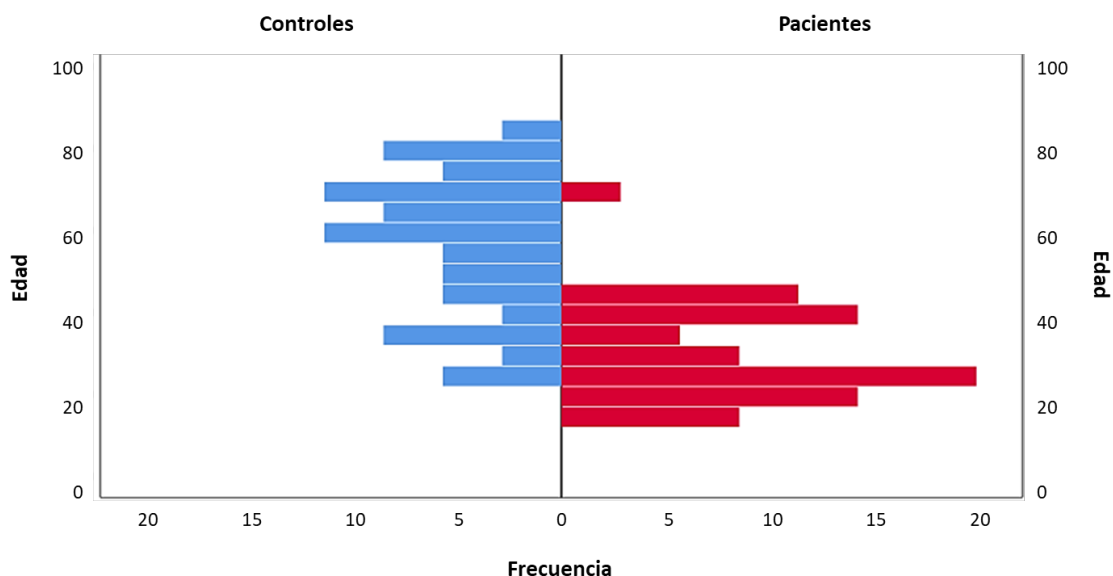


Figura 19. Distribución por edades del grupo de controles y del grupo de pacientes en el estudio transcriptómico.

b) Grupo de pacientes

En el grupo de pacientes se incluyeron 30 individuos que fueron diagnosticados de asma alérgica por monosensibilización a pólenes tras una evaluación clínica por parte de los facultativos del Servicio de Alergia del CAUSA. La proporción por sexos se desplazó ligeramente hacia el sexo femenino, que supuso el 56,7 % de los pacientes frente al 43,3 % correspondiente al sexo masculino. La media de edad fue de 30 años (DE = 13). La mediana de los niveles séricos de IgE fue de 179 kU/L (RI = 239). Además, la mediana del recuento de eosinófilos fue de $310/\mu\text{l}$ (RI = 311) y la mediana del recuento de neutrófilos fue de $3295/\mu\text{l}$ (RI = 1970).

Gravedad del asma

La gravedad del asma se clasificó según las categorías establecidas por la GEMA (2). El asma persistente moderada fue la más frecuente (43,3 %) seguida del asma intermitente (33,3 %), mientras que el asma persistente grave fue poco frecuente (6,7 %) (Figura 20).

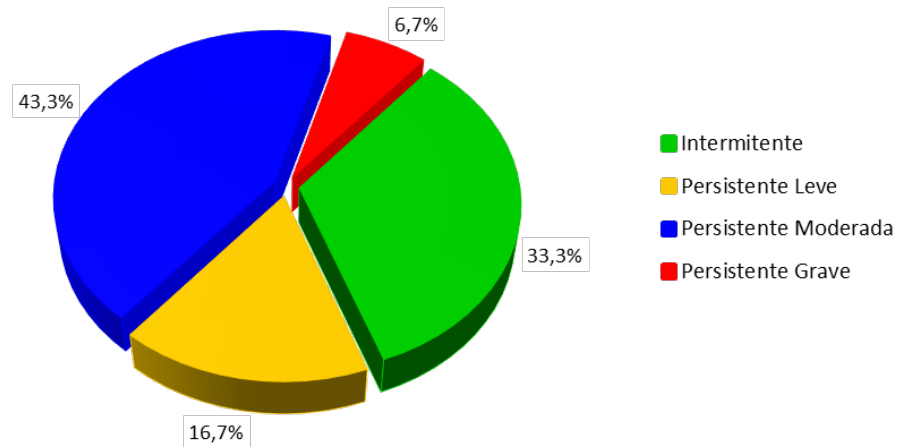


Figura 20. Distribución de los pacientes según la gravedad del asma en el estudio transcriptómico.

Antecedentes familiares

Se recogieron los antecedentes familiares de asma y atopia de todos los pacientes. Se observó que el 30 % de los pacientes presentó algún tipo de antecedente (Figura 21).

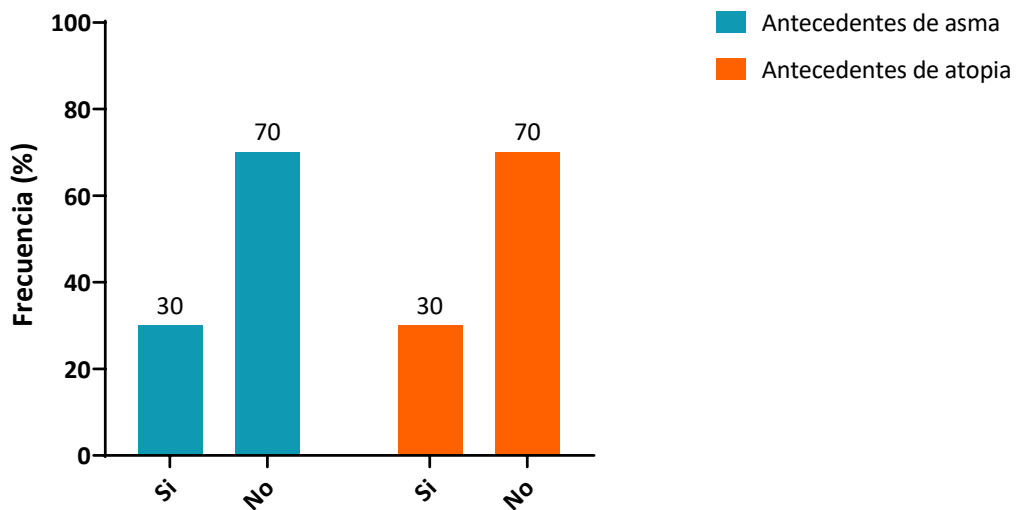


Figura 21. Antecedentes familiares de asma y atopia en pacientes diagnosticados de asma en el estudio transcriptómico.

Hipersensibilidad a los AINE y EREA

Se recogieron datos sobre la hipersensibilidad a los AINE en todos los pacientes, observándose que ningún paciente presentó hipersensibilidad.

Tratamiento con glucocorticoides e inmunoterapia

Se recogieron los diferentes tratamientos que recibían los pacientes, observándose que el 53,3 % de los pacientes recibía tratamiento con glucocorticoides inhalados y el 46,7 % inmunoterapia específica con alérgenos (Figura 22). Ninguno de los pacientes recibía tratamiento con glucocorticoides orales.

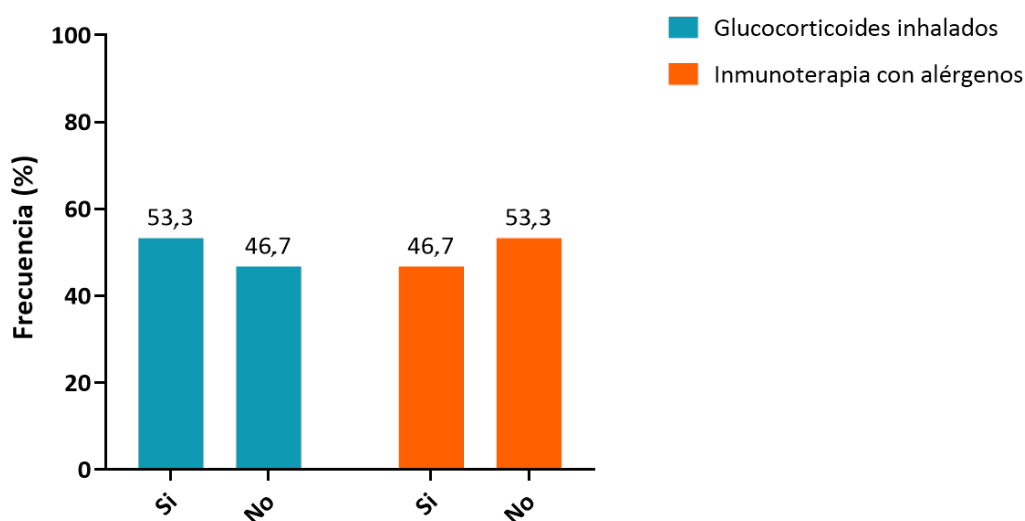


Figura 22. Tratamiento con glucocorticoides inhalados e inmunoterapia específica con alérgenos en pacientes diagnosticados de asma en el estudio transcriptómico.

4.1.2. Análisis de expresión diferencial

Con el objetivo de estudiar cambios en los niveles de expresión de transcritos entre el grupo de controles y el grupo de pacientes con asma alérgica, se realizó un análisis de expresión diferencial, observándose diferencias significativas entre ambos grupos (P_{adj} -valor < 0,05). Se encontraron un total de 109 transcritos con expresión diferencial significativa y un valor absoluto de *fold change* > 1,5 (Figura 23), incluyendo transcritos codificantes y no codificantes, como lncRNA (*long non-coding RNAs*), miRNAs

(microRNAs), snRNAs (*small nuclear RNAs*) o snoRNAs (*small nucleolar RNAs*). Entre todos ellos, se seleccionaron los transcritos codificantes, obteniéndose un total de 44, de los cuales 21 transcritos estaban sobreexpresados (*fold change* > 1,5; Tabla 5) y 23 transcritos estaban infraexpresados (*fold change* < -1,5; Tabla 6) en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles.

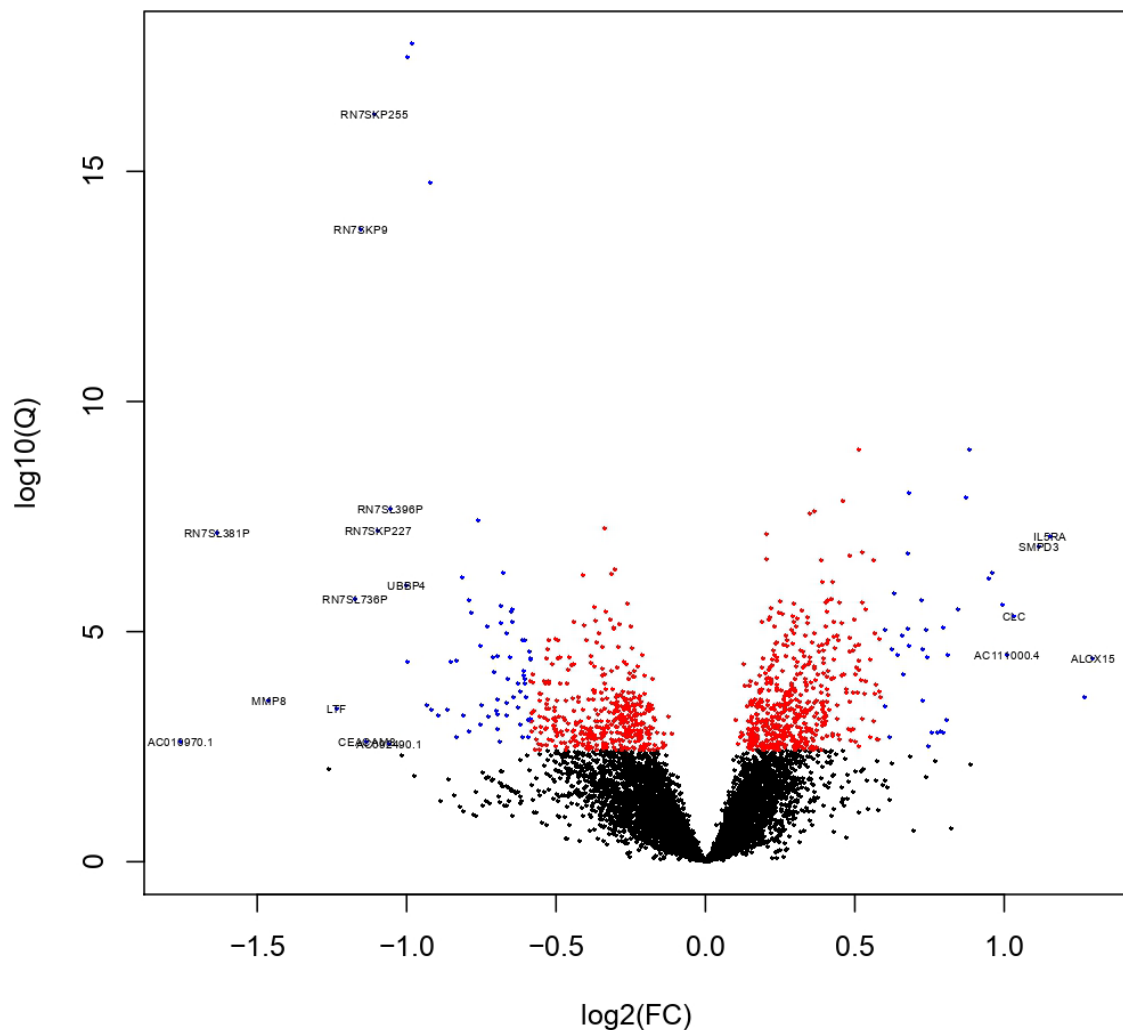


Figura 23. Volcano plot del análisis de expresión diferencial entre el grupo de controles y el grupo de pacientes con asma alérgica. Cada transcrito está representado por un punto en función del \log_2 fold change (eje de abscisas) y \log_{10} Padj-valor (eje de ordenadas). En rojo se muestran los transcritos que presentaron diferencias significativas entre ambos grupos ($P_{adj} < 0,05$) y en azul se muestran los transcritos que, además, tuvieron un valor absoluto de fold change > 1,5. Se indican los nombres de los transcritos que tuvieron un valor absoluto de \log_2 fold change > 1.

Tabla 5. Listado de los 21 transcritos codificantes con expresión diferencial que se encontraron sobreexpresados en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles (fold change > 1,5 y P_{adj}-valor < 0,05).

Ensemble ID	Gen	Proteína codificada	Fold change	P _{adj} -valor
ENSG00000161905	<i>ALOX15</i>	15-lipoxigenasa de ácido araquidónico	2,45	3,50E-03
ENSG00000091181	<i>IL5RA</i>	Subunidad alfa del receptor de la interleucina 5	2,22	6,33E-05
ENSG00000103056	<i>SMPD3</i>	Esfingomielina fosfodiesterasa-3	2,17	9,40E-05
ENSG00000105205	<i>CLC</i>	Galectina-10	2,05	1,03E-03
ENSG00000183134	<i>PTGDR2</i>	Receptor 2 de la prostaglandina D2	1,99	7,44E-04
ENSG00000134489	<i>HRH4</i>	Receptor de histamina H4	1,93	2,94E-04
ENSG00000152207	<i>CYSLTR2</i>	Receptor 2 de cisteinil-leucotrienos	1,84	2,64E-06
ENSG00000171659	<i>GPR34</i>	Receptor 34 acoplado a proteína G	1,83	1,94E-05
ENSG00000143297	<i>FCRL5</i>	Proteína 5 tipo receptor Fc	1,75	3,19E-03
ENSG00000255587	<i>RAB44</i>	Proteína Rab-44 relacionada con Ras	1,74	1,33E-03
ENSG00000276231	<i>PIK3R6</i>	Subunidad reguladora 6 de la fosfoinositol 3-quinasa	1,67	1,43E-03
ENSG00000174837	<i>ADGRE1</i>	Receptor E1 de adhesión acoplado a proteína G	1,65	6,93E-04
ENSG00000030419	<i>IKZF2</i>	Proteína de dedo de zinc Helios	1,60	1,67E-05
ENSG00000154358	<i>OBSCN</i>	Obscurina	1,60	1,39E-03
ENSG00000050438	<i>SLC4A8</i>	Intercambiador de cloro/bicarbonato mediado por sodio electroneutro	1,60	1,23E-04
ENSG00000133317	<i>LGALS12</i>	Galectina-12	1,58	5,67E-03
ENSG00000197937	<i>ZNF347</i>	Proteína de dedo de zinc 347	1,58	1,80E-03
ENSG00000004799	<i>PDK4</i>	Piruvato deshidrogenasa quinasa isoforma 4	1,56	3,19E-03
ENSG00000073605	<i>GSDMB</i>	Gasdermina B	1,55	5,50E-04
ENSG00000188822	<i>CNR2</i>	Receptor cannabinoide de tipo 2	1,53	3,41E-02
ENSG00000214029	<i>ZNF891</i>	Proteína de dedo de zinc 891	1,52	1,45E-03

Tabla 6. Listado de los 23 transcritos codificantes con expresión diferencial que se encuentran infraexpresados en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles (fold change < -1,5 y P_{adj}-valor < 0,05).

Ensemble ID	Gen	Proteína codificada	Fold change	P _{adj} -valor
ENSG00000118113	<i>MMP8</i>	Colagenasa de neutrófilos	-2,75	1,27E-02
ENSG0000012223	<i>LTF</i>	Lactotransferrina	-2,35	1,58E-02
ENSG00000124469	<i>CEACAM8</i>	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 8	-2,19	3,90E-02
ENSG00000118520	<i>ARG1</i>	Arginasa-1	-2,00	3,74E-03
ENSG00000168209	<i>DDIT4</i>	Proteína 4 inducible por daño en el ADN	-1,91	1,46E-02
ENSG00000179094	<i>PER1</i>	Proteína circadiana periódica-1	-1,86	1,96E-02
ENSG00000096006	<i>CRISP3</i>	Proteína 3 secretora rica en cisteína	-1,78	3,47E-02
ENSG00000005961	<i>ITGA2B</i>	Integrina alfa-IIb	-1,75	1,97E-02
ENSG00000179869	<i>ABCA13</i>	Miembro 13 de la subfamilia A de proteínas transportadoras ABC	-1,73	2,92E-02
ENSG00000100985	<i>MMP9</i>	Metaloproteínasa de la matriz-9	-1,69	2,43E-02
ENSG00000124102	<i>PI3</i>	Elafina	-1,65	2,03E-02
ENSG00000122025	<i>FLT3</i>	Receptor tirosina quinasa 3 tipo FMS	-1,64	3,39E-03
ENSG00000120885	<i>CLU</i>	Clusterina	-1,63	1,67E-02
ENSG00000166091	<i>CMTM5</i>	Proteína 5 que contiene el dominio transmembrana MARVEL tipo CKLF	-1,62	2,81E-02
ENSG00000140479	<i>PCSK6</i>	Proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 6	-1,61	3,96E-02
ENSG00000167476	<i>JSRP1</i>	Proteína 1 de unión al retículo sarcoplásmico	-1,61	1,23E-03
ENSG00000125148	<i>MT2A</i>	Metalotioneína-2	-1,59	1,38E-02
ENSG00000079308	<i>TNS1</i>	Tensina-1	-1,59	1,97E-02
ENSG00000133069	<i>TMCC2</i>	Proteína 2 de dominios transmembrana y coiled-coil	-1,56	1,17E-02
ENSG00000185950	<i>IRS2</i>	Sustrato del receptor de la insulina 2	-1,54	7,48E-03
ENSG00000184792	<i>OSBP2</i>	Proteína 2 de unión al oxisterol	-1,54	2,43E-02
ENSG00000274180	<i>NATD1</i>	NATD1	-1,52	6,54E-03
ENSG00000163735	<i>CXCL5</i>	Quimiocina con motivo CXC-5	-1,51	3,49E-02

Resultados

El mapa colorimétrico (*heatmap*) mostró también las diferencias de expresión de los 44 transcritos codificantes entre el grupo de controles y el grupo de pacientes con asma alérgica (Figura 24).

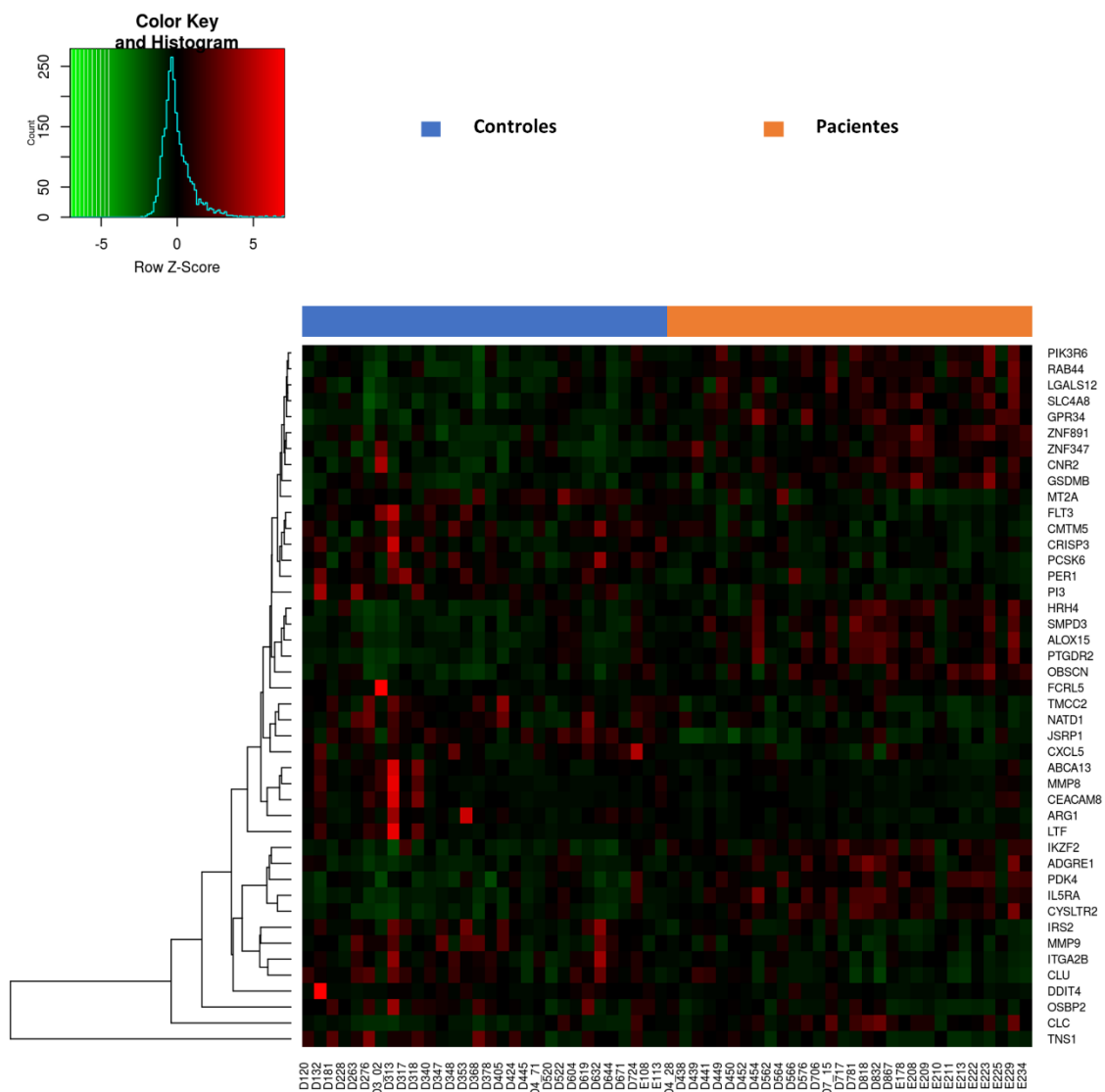


Figura 24. Mapa colorimétrico (*heatmap*) de los 44 transcritos codificantes con expresión diferencial en el grupo de controles y el grupo de pacientes con asma alérgica. Los transcritos se representan en filas y los niveles de expresión de cada muestra en columnas. La escala de color de los niveles de expresión indica sobreexpresión (rojo) o infraexpresión (verde). Se empleó la agrupación jerárquica utilizando las distancias euclidianas para los transcritos, presentando el dendrograma de grupos en el lado izquierdo del gráfico.

4.1.3. Análisis de enriquecimiento ontológico

Se realizó un análisis de enriquecimiento ontológico de los transcritos codificantes con expresión diferencial en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles. Para ello se agrupó la información en tres categorías; la participación en procesos biológicos, la función molecular y el componente celular.

Procesos biológicos

Predominaron aquellos relacionados con procesos celulares, sistema inmunitario, respuesta a estímulos y regulación biológica (Tabla 7). Destacaron procesos como “activación de leucocitos” (FDR 4,56E-03), “inmunidad mediada por leucocitos” (FDR 5,77E-03), “respuesta de defensa” (FDR 5,77E-03) y “regulación de procesos del sistema inmunitario” (FDR 2,68E-02). Además, en la mayoría de los procesos biológicos predominaron los transcritos infraexpresados, principalmente *ARG1*, *CLU*, *FLT3*, *LTF*, *MMP8* y *MMP9*. No obstante, también estaban implicados con frecuencia transcritos sobreexpresados como *ALOX15*, *CLC*, *CNR2*, *HRH4*, *IL5RA* y *PIK3R6*.

Funciones moleculares

Las funciones más destacadas fueron “actividad endopeptidasa tipo serina” (FDR 3,24E-02), en la que estaban implicados transcritos infraexpresados como *LTF*, *MMP8*, *MMP9*, *PCSK6* y *PI3*; y “actividad de señalización de receptores transmembrana” (FDR 4,35E-02), en la que estaban implicados *ADGRE1*, *CNR2*, *CXCL5*, *CYSLTR2*, *HRH4*, *IL5RA*, *IRS2*, *ITGA2B*, *OBSCN*, *PIK3R6* y *PTGDR2*, siendo la mayoría de ellos sobreexpresados.

Componente celular

Predominaron los transcritos relacionados con “gránulos de secreción” (FDR 2,48E-03) como *ABCA13*, *ARG1*, *CEACAM8*, *CLU*, *CRISP3*, *ITGA2B*, *LTF*, *MMP8*, *MMP9* y *RAB44*; “superficie celular” (FDR 7,74E-03) como *ADGRE1*, *CEACAM8*, *CLU*, *FCRL5*, *FLT3*, *IL5RA*, *ITGA2B*, *LTF*, *PCSK* y *TNS1*; y “matriz extracelular” (FDR 1,30E-02) como *CLC*, *CLU*, *CRISP3*, *MMP8*, *MMP9*, *PCSK6* y *PI3*.

Tabla 7. Análisis de enriquecimiento ontológico de procesos biológicos de los transcritos codificantes con expresión diferencial en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles.

Resumen de los principales procesos biológicos y los genes implicados.

Proceso biológico	Términos GO	FDR	Genes
Procesos celulares			
Activación de leucocitos	GO:0045321	4,56E-03	ABCA13, ARG1, CEACAM8, CLC, CLU, CNR2, CRISP3, FLT3, IRS2, LTF, MMP8, MMP9, PIK3R6, RAB44
Secreción	GO:0046903	1,37E-02	ABCA13, ARG1, CEACAM8, CLU, CRISP3, FLT3, IRS2, ITGA2B, LTF, MMP8, MMP9, PCSK6, RAB44, SMPD3
Proliferación de leucocitos	GO:0070661	1,78E-02	ARG1, CLC, CLU, FLT3, IL5RA, IRS2
Vía de señalización mediada por citoquinas	GO:0019221	4,34E-02	ALOX15, ARG1, CXCL5, FLT3, IL5RA, IRS2, MMP9, MT2A
Transducción de señales	GO:0023014	4,93E-02	ALOX15, CYSLTR2, FLT3, HRH4, IL5RA, IRS2, MMP8, PER1, PIK3R6
Sistema inmunitario			
Inmunidad mediada por leucocitos	GO:0002443	5,77E-03	ABCA13, ARG1, CEACAM8, CLC, CLU, CRISP3, LTF, MMP8, MMP9, PIK3R6, RAB44
Desgranulación de neutrófilos	GO:0043312	8,37E-03	ABCA13, ARG1, CEACAM8, CRISP3, LTF, MMP8, MMP9, RAB44
Respuesta a estímulos			
Respuesta de defensa	GO:0006952	5,77E-03	ALOX15, ARG1, CLU, CNR2, CRISP3, CXCL5, DDIT4, HRH4, IL5RA, LTF, MMP8, MMP9, MT2A, PER1, PIK3R6
Respuesta inflamatoria	GO:0006954	1,47E-02	ALOX15, CLU, CNR2, CXCL5, HRH4, IL5RA, MMP8, MMP9, PER1
Respuesta celular al estímulo de glucocorticoides	GO:0071385	3,07E-02	ARG1, DDIT4, FLT3
Regulación biológica			
Regulación de procesos del sistema inmunitario	GO:0002682	2,68E-02	ALOX15, ARG1, CLC, CLU, CNR2, FLT3, IRS2, ITGA2B, LTF, MMP8, MMP9, PIK3R6, SMPD3
Regulación de la producción de citoquinas	GO:0001817	3,76E-02	ARG1, CLC, CLU, FLT3, IL5RA, LTF, MMP8, PER1
Regulación de la activación de leucocitos	GO:0002694	4,47E-02	ARG1, CLC, CNR2, FLT3, IRS2, MMP8, PIK3R6

GO: *gene ontology*; FDR: *false discovery rate*, ajustado mediante el método de Benjamini-Hochberg.

En cuanto a las principales vías biológicas implicadas, destacaron el sistema inmunitario innato (FDR 8,37E-03), la desgranulación de neutrófilos (FDR 5,93E-02) y la señalización mediante receptores acoplados a proteínas G (FDR 4,36E-01).

Además, se realizó una red de interacciones proteicas entre las proteínas codificadas por los transcritos con expresión diferencial con el objetivo de analizar la interacción entre ellas. Se identificaron cinco agrupaciones o *clusters* (A, B, C, D y E), que estaban formados por proteínas codificadas tanto por transcritos sobreexpresados como infraexpresados (Figura 25).

Cluster A

Formado por 10 proteínas, siendo 8 de ellas codificadas por transcritos expresados diferencialmente (*ABCA13*, *ARG1*, *CEACAM8*, *FLT3*, *ITGA2B*, *LTF*, *MMP8* y *RAB44*), la mayoría de ellos infraexpresados. Se relacionó principalmente con procesos biológicos como “respuesta inmune”, “secreción celular”, “activación de leucocitos” y “desgranulación de neutrófilos”.

Cluster B

Formado por 6 proteínas, siendo 5 de ellas codificadas por transcritos expresados diferencialmente (*CNR2*, *CXCL5*, *HRH4*, *IL5RA* y *PTGDR2*), la mayoría de ellos sobreexpresados. Se relacionó principalmente con procesos biológicos como “respuesta a estímulos”, “respuesta inflamatoria”, “transducción de señales” y “regulación de la señalización”.

Cluster C

Formado por 8 proteínas, siendo 7 de ellas codificadas por transcritos expresados diferencialmente (*CLU*, *IRS2*, *LGALS12*, *MMP9*, *PI3*, *PIK3R6* y *TNS1*). Se relacionó principalmente con procesos biológicos como “respuesta a estímulos” y “regulación de la señalización”.

Cluster D

Formado por 3 proteínas codificadas por transcritos expresados diferencialmente (*ALOX15*, *CLC* y *CRISP3*). Se relacionó con diferentes procesos biológicos entre los que destacaron “respuesta inmune”, “procesos metabólicos” y “regulación de procesos”.

Cluster E

Formado por 4 proteínas, siendo 2 de ellas codificadas por transcritos expresados diferencialmente (*PDK4* y *PER1*). Se relacionó con diferentes procesos biológicos entre los que destacaron “respuesta a estímulos”, “procesos metabólicos” y “regulación de procesos”.

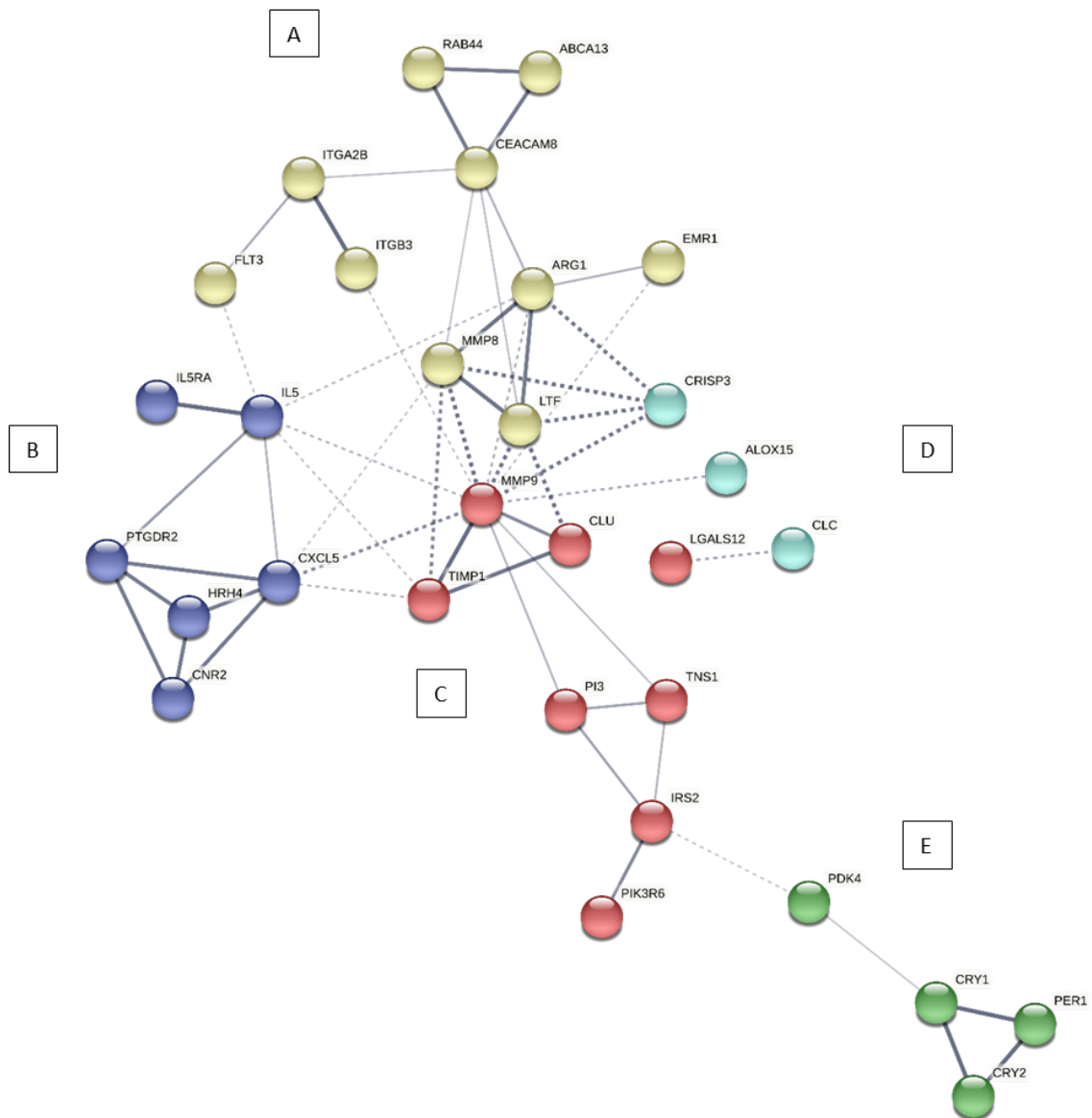


Figura 25. Red de interacciones proteicas entre las proteínas codificadas por los transcritos con expresión diferencial en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles. Obtenida mediante el software STRING. Cada nodo representa una proteína y la fuerza de las interacciones se indica mediante la intensidad de la línea. Los diferentes clusters se muestran en amarillo (A), azul oscuro (B), rojo (C), azul claro (D) y verde (E).

4.1.4. *IL5RA* en el estudio transcriptómico

Entre todos los transcritos con expresión diferencial seleccionados al comparar el grupo de pacientes con asma alérgica con el grupo de controles, *IL5RA* llamó la atención por su posible papel como biomarcador en el asma. Esto fue debido a que en el análisis de expresión diferencial fue uno de los transcritos con mejores resultados, considerando *fold change* (2,22) y *P_{adj}*-valor (6,33E-05), predominando entre los transcritos sobreexpresados. Además, en el análisis de enriquecimiento ontológico destacó su implicación en el sistema inmunitario al relacionarse con procesos biológicos como “respuesta inflamatoria”, “transducción de señales” y “vía de señalización mediada por citocinas”, siendo además su principal función molecular “receptor de citocinas”. En cuanto a su participación en vías biológicas, se relacionó con la cascada Ras/MAPK y la señalización mediada por interleucinas.

Al relacionar los niveles de expresión de *IL5RA* con el recuento de eosinófilos en sangre periférica, destacó la presencia de una mayor homogeneidad en el grupo de controles respecto al grupo de pacientes con asma alérgica, donde la dispersión observada fue superior (Figura 26).

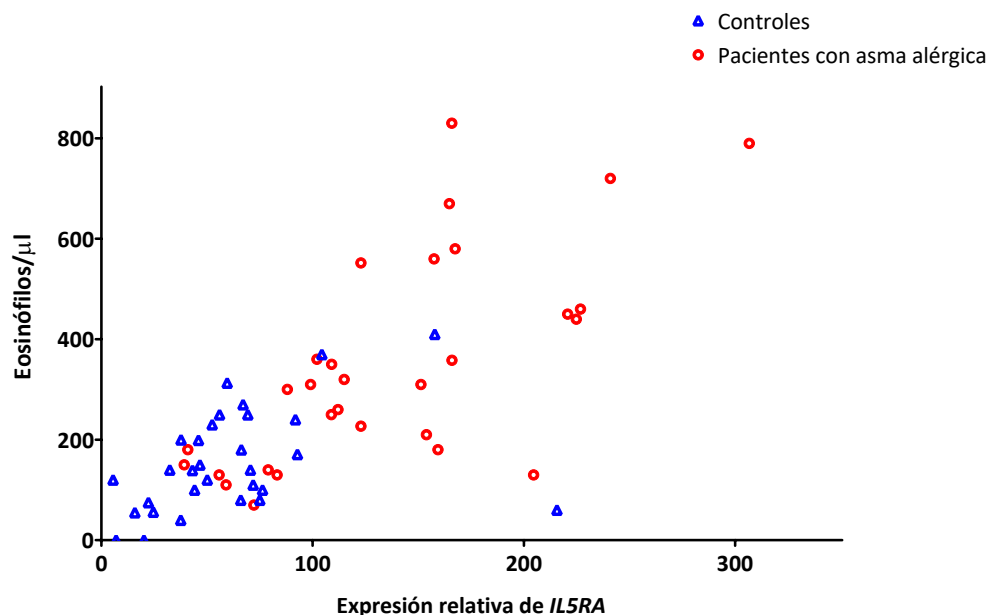


Figura 26. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de *IL5RA* del grupo de controles y el grupo de pacientes con asma alérgica en el estudio transcriptómico.

4.2. ESTUDIO DE VALIDACIÓN

4.2.1. Características de la población a estudio

En este estudio se han analizado un total de 298 individuos, 100 controles y 198 pacientes diagnosticados de asma (Tabla 8). La distribución por sexos estuvo ligeramente desplazada hacia el sexo femenino, que supuso el 58,7 % del total de los individuos participantes. Además, se observó una media de edad significativamente mayor en el grupo de controles (Figura 27). La mediana de los niveles de IgE sérica fue significativamente mayor en el grupo de pacientes. Los niveles de FeNO solo se valoraron en el grupo de pacientes. No se observaron diferencias significativas en relación al recuento de neutrófilos.

Tabla 8. Características de la población en el estudio de validación.

	N	Sexo (%)		Edad (años)	IgE (kU/L)	FeNO (ppb)
		F	M	(Media ± DE)	(Mediana ± RI)	(Mediana ± RI)
Controles	100	66,0	34,0	57 ± 17	28,8 ± 57,7	-
Pacientes	198	55,1	44,9	45 ± 19	173,0 ± 398,4	32 ± 34
P-valor		0,081		< 0,001	< 0,001	

DE: desviación estándar; F: femenino; M: masculino; RI: rango intercuartílico.

a) Grupo de controles

En el grupo de controles se incluyeron 100 individuos que fueron caracterizados tras una evaluación clínica por parte de los facultativos del Servicio de Alergia del CAUSA. Todos ellos carecían de síntomas o antecedentes familiares de enfermedades alérgicas o respiratorias y presentaron pruebas cutáneas negativas en la batería de aeroalérgenos locales. La proporción por sexos se desplazó hacia el sexo femenino, que supuso el 66 % de los controles frente al 34 % correspondiente al sexo masculino. La media de edad fue de 57 años (DE = 17). La mediana de los niveles séricos de IgE fue de 28,8 kU/L (RI = 57,7). La mediana del recuento de neutrófilos fue de 3970/ μ l (RI = 2100).

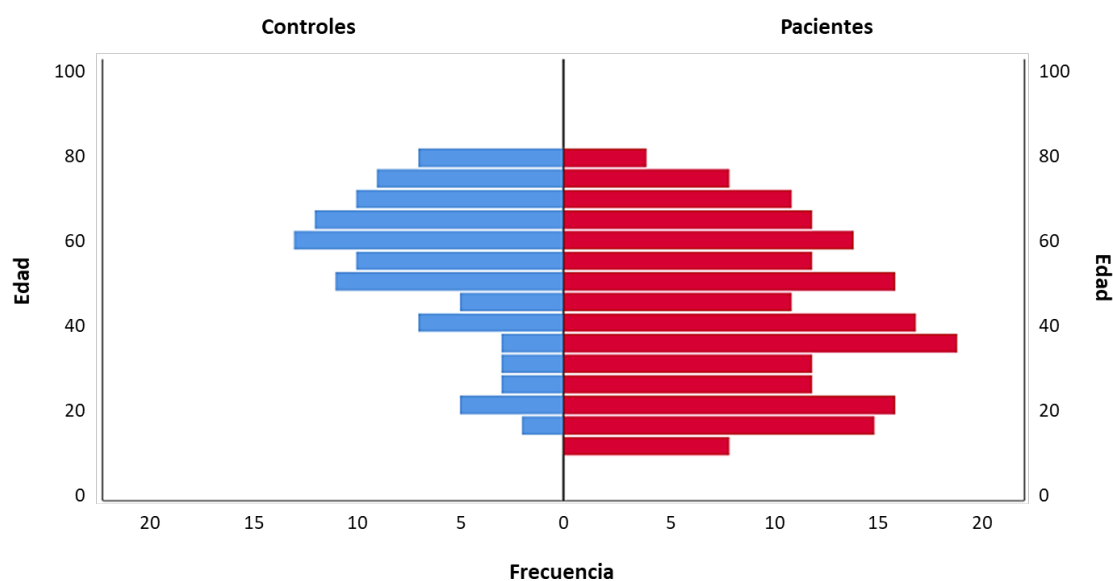


Figura 27. Distribución por edades del grupo de controles y del grupo de pacientes en el estudio de validación.

b) Grupo de pacientes

En el grupo de pacientes se incluyeron 198 individuos que fueron diagnosticados de asma tras una evaluación clínica por parte de los facultativos del Servicio de Alergia del CAUSA. La proporción por sexos se desplazó ligeramente hacia el sexo femenino, que supuso el 55,1 % de los pacientes frente al 44,9 % correspondiente al sexo masculino, aunque la diferencia no fue tan marcada como en el grupo de controles. La media de edad fue de 45 años (DE = 19). La mediana de los niveles séricos de IgE fue de 173 kU/L (RI = 398,4) y la mediana de los niveles de FeNO fue de 32 ppb (RI = 34). La mediana del recuento de neutrófilos fue de 3680/ μ l (RI = 2240).

Las características de los diferentes grupos de pacientes asmáticos estudiados en función de la presencia de atopía, poliposis nasosinusal, inicio del asma y eosinofilia se muestran en la tabla 9. La proporción por sexos en los diferentes grupos mantiene la tendencia descrita anteriormente, excepto en el caso del asma alérgica con poliposis nasosinusal, en el que se desplazó hacia el sexo masculino (60,5 %). La media de edad fue mayor en el asma no alérgica, 58 años (DE = 15), y en el asma de inicio tardío, 53 años (DE = 15), respecto al resto de pacientes ($P < 0,001$). También se observó una media de edad mayor en los pacientes asmáticos con poliposis nasosinusal, 54 años (DE = 16),

respecto a los pacientes que no la presentaban, 38 años (DE = 18) ($P < 0,001$). En cuanto a los niveles séricos de IgE, en el asma no alérgica se observó una mediana de 76,3 kU/L (RI = 114,6), notablemente inferior respecto a los pacientes con asma alérgica ($P < 0,001$). Además, los niveles de FeNO fueron mayores en los pacientes que presentaban asma con poliposis nasosinusal respecto a los pacientes que no la presentaban ($P = 0,040$).

Tabla 9. Características de los grupos de pacientes asmáticos estudiados.

	N	Sexo (%)		Edad (años) (Media \pm DE)	IgE (kU/L) (Mediana \pm RI)	FeNO (ppb) (Mediana \pm RI)
		F	M			
Asma no alérgica	77	61,0	39,0	58 \pm 15	76,3 \pm 114,6	29 \pm 32
ANA sin PN	34	73,5	26,5	56 \pm 16	49,1 \pm 100,9	18 \pm 25
ANA con PN	43	51,2	48,8	60 \pm 14	83,0 \pm 258,7	34 \pm 28
Asma alérgica	121	51,2	48,8	36 \pm 16	301,5 \pm 481,8	36 \pm 46
AA sin PN	83	56,6	43,4	31 \pm 14	320,0 \pm 457,0	34 \pm 41
AA con PN	38	39,5	60,5	47 \pm 15	268,0 \pm 642,0	42 \pm 90
Asma de inicio precoz	80	62,5	37,5	32 \pm 17	268,0 \pm 394,7	28 \pm 34
Asma de inicio tardío	118	50,0	50,0	53 \pm 15	126,0 \pm 406,1	33 \pm 36
Asma no eosinofílica	35	65,7	34,3	45 \pm 17	104,1 \pm 268,0	24 \pm 18
Asma eosinofílica	135	52,6	47,4	46 \pm 20	193,0 \pm 400,0	35 \pm 37

AA: asma alérgica; ANA: asma no alérgica; DE: desviación estándar; F: femenino; M: masculino; PN: poliposis nasosinusal; RI: rango intercuartílico.

Influencia de la atopia y la poliposis nasosinusal

El 61,1 % de los pacientes diagnosticados de asma presentó atopia, suponiendo el asma alérgica sin poliposis nasosinusal una mayor proporción que el asma alérgica con poliposis nasosinusal. Por otro lado, el 38,9 % de los pacientes asmáticos no presentó atopia, siendo similar la proporción entre el asma no alérgica sin poliposis nasosinusal y el asma no alérgica con poliposis nasosinusal (Figura 28).

Inicio del asma

En cuanto a la edad de inicio del asma, el 40,4 % de los pacientes presentó asma de inicio precoz mientras que el 59,6 % presentó asma de inicio tardío (Figura 29). Además, se observó que el 82,5 % de los pacientes con asma de inicio precoz presentaba atopía y el 73,8 % no presentaba poliposis nasosinusal, mientras que en el asma de inicio tardío las proporciones fueron similares.

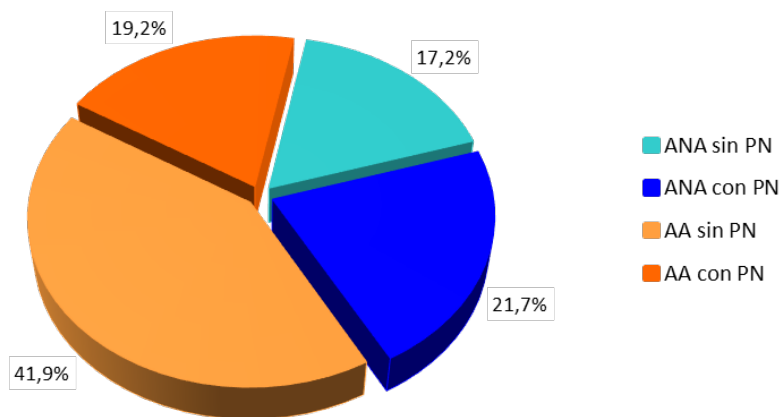


Figura 28. Distribución de los pacientes asmáticos según la clasificación del asma por la presencia de atopía y/o poliposis nasosinusal en el estudio de validación. AA: asma alérgica; ANA: asma no alérgica; PN: poliposis nasosinusal.

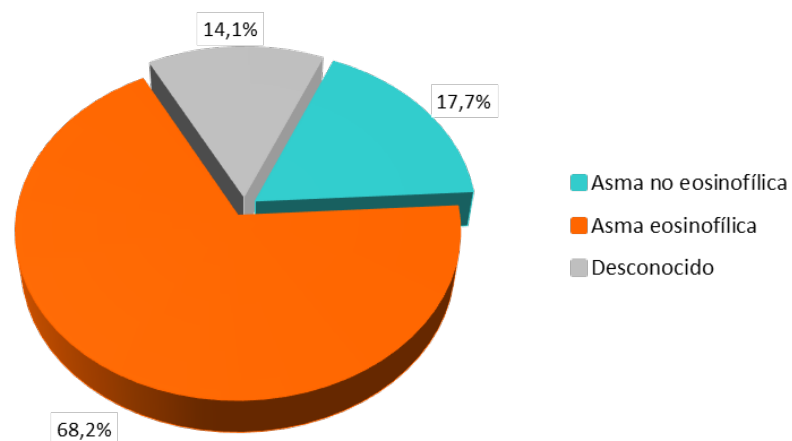


Figura 29. Distribución de los pacientes según edad de inicio del asma.

Eosinofilia

Por otro lado, el 17,7 % de los pacientes presentó asma no eosinofílica mientras que el 68,2 % presentó asma eosinofílica (Figura 30). No se pudo disponer de los niveles de eosinófilos de algunos de los pacientes.

Gravedad del asma

La gravedad del asma se clasificó según las categorías establecidas por la GEMA (2). El asma persistente moderada fue la más frecuente (42,1 %) seguida del asma intermitente (25,9 %), mientras que el asma persistente grave fue la menos frecuente (13,7 %) (Figura 31).

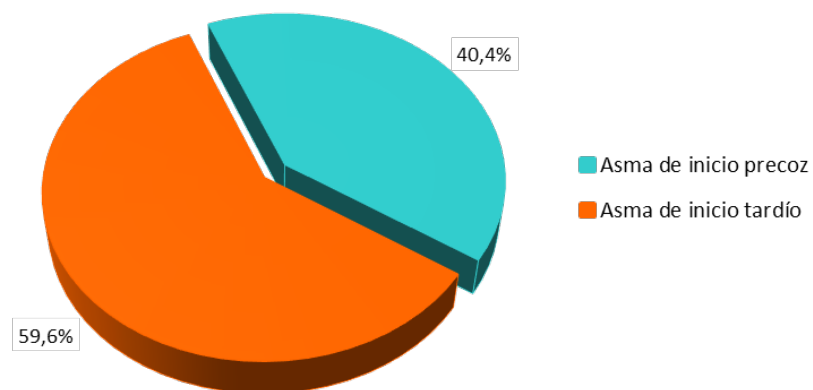


Figura 30. Distribución de los pacientes asmáticos según la ausencia o presencia de eosinofilia.

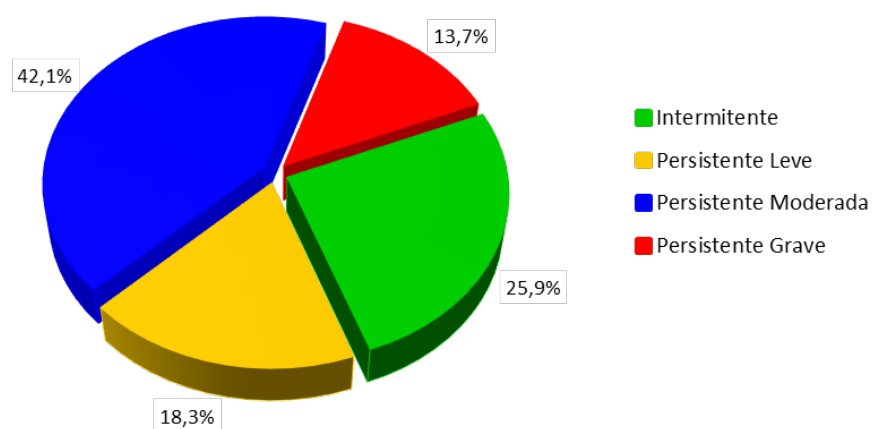


Figura 31. Distribución de los pacientes según la gravedad del asma en el estudio de validación.

Sensibilización alérgica

Entre los pacientes diagnosticados de atopia, el 66,9 % presentó polisensibilización a varios grupos de aeroalérgenos, siendo lo menos habitual la sensibilización a los cuatro grupos. En los pacientes monosensibilizados predominó la monosensibilización por los pólenes (57,5 %) frente a ácaros y epitelios (Figura 32).

En general, el grupo de aeroalérgenos para el que más frecuentemente se observó sensibilización fue el de los pólenes (79,3 %), seguido de epitelios (61,1 %), ácaros (42,1 %) y hongos (21,5 %).

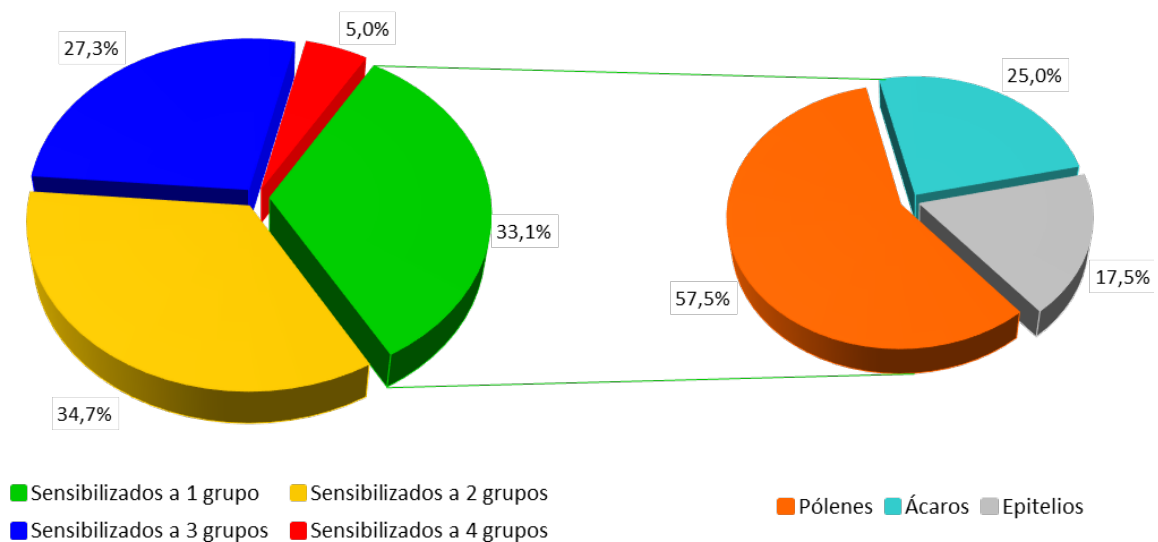


Figura 32. Distribución de los pacientes según la sensibilización alérgica y los aeroalérgenos en monosensibilizados en el estudio de validación.

Antecedentes familiares

Se recogieron los antecedentes familiares de asma y atopia de todos los pacientes (Figura 33). Se observó que el 33,3 % de los pacientes presentó antecedentes de asma y el 30,8 % presentó antecedentes de atopia, siendo alérgicos el 77 % de ellos. En general, el 47,5 % de los pacientes presentó algún tipo de antecedente.

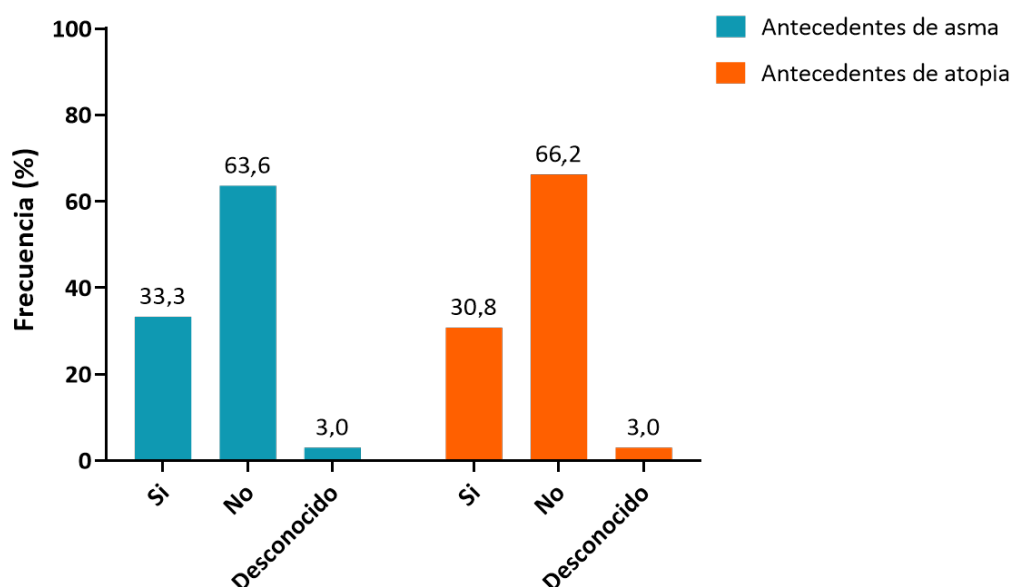


Figura 33. Antecedentes familiares de asma y atopia en pacientes diagnosticados de asma en el estudio de validación.

Hipersensibilidad a los AINE y EREA

Se recogieron datos sobre la hipersensibilidad a los AINE en todos los pacientes, observándose que el 17,7 % presentó algún tipo de hipersensibilidad. La hipersensibilidad a los AINE respiratoria se observó con una frecuencia del 14,7 % frente a la hipersensibilidad a los AINE cutánea, que fue del 4,6 % (Figura 34). Solamente el 1,5 % de los pacientes presentó ambas entidades.

Aquellos pacientes asmáticos que, además de hipersensibilidad a los AINE, presentaron poliposis nasosinusal fueron diagnosticados de EREA. Se observó que el 11,1 % de los pacientes presentó EREA, siendo el 4 % EREA con alergia y el 7,1 % EREA sin alergia (Figura 35).

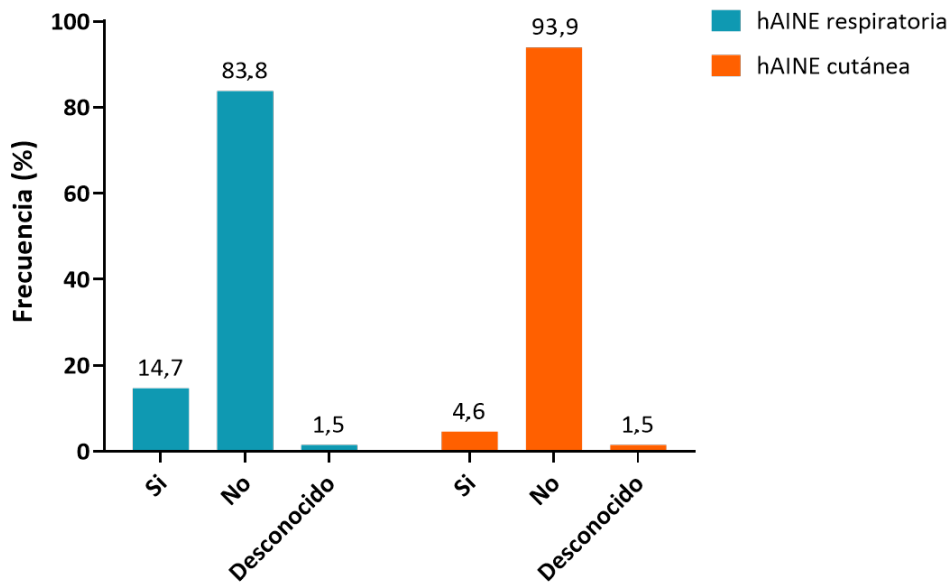


Figura 34. Hipersensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos (hAINE) respiratoria y cutánea en pacientes diagnosticados de asma en el estudio de validación.

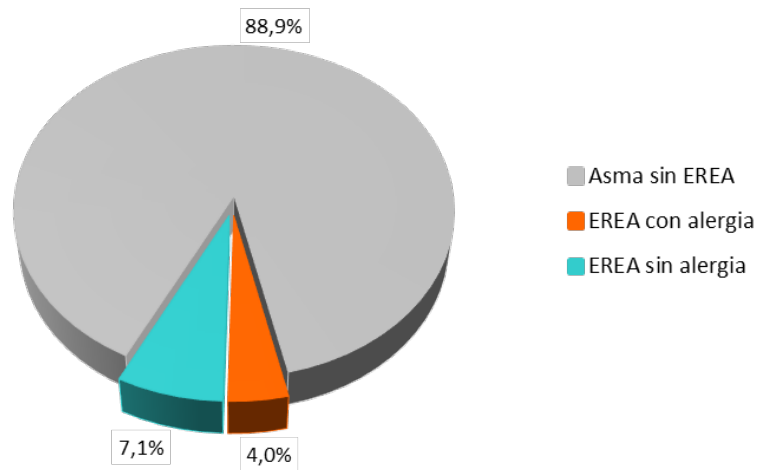


Figura 35. Presencia de enfermedad respiratoria exacerbada por los antiinflamatorios no esteroideos (EREA) con alergia y sin alergia en los pacientes diagnosticados de asma en el estudio de validación.

Tratamiento con glucocorticoides e inmunoterapia

Se recogieron los diferentes tratamientos que recibían los pacientes, observándose que el 68,2 % de los pacientes recibía tratamiento con glucocorticoides inhalados y el 27,8 % inmunoterapia específica con alérgenos (Figura 36).

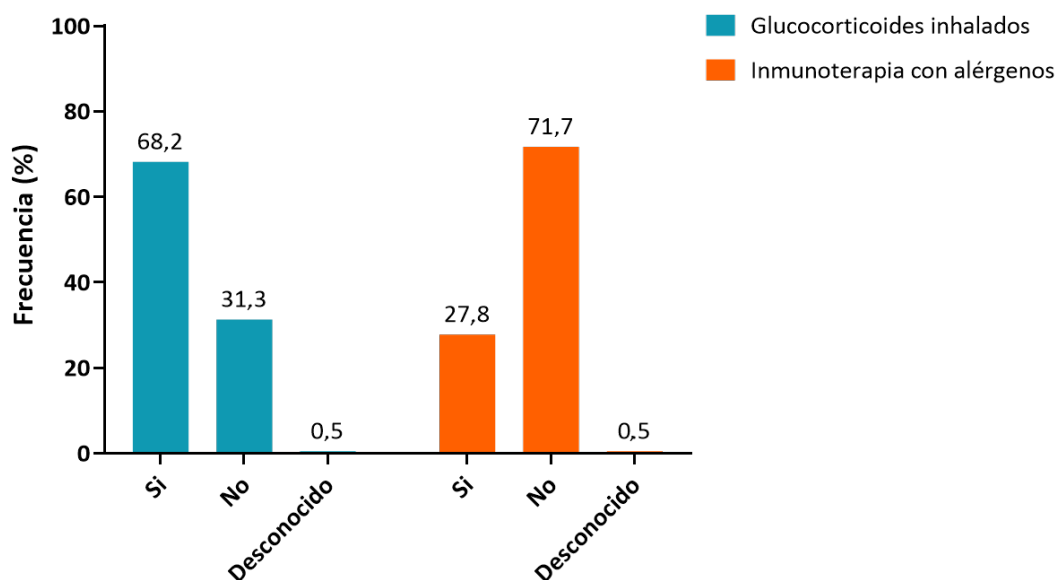


Figura 36. Tratamiento con glucocorticoides inhalados e inmunoterapia específica con alérgenos en pacientes diagnosticados de asma en el estudio de validación.

4.2.2. Estudio de asociación de las variables clínicas con el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA*

Se observó un incremento significativo tanto en el recuento de eosinófilos en sangre periférica como en los niveles de expresión de *IL5RA* en los pacientes asmáticos respecto al grupo de controles ($P < 0,001$). La mediana de eosinófilos fue 110 ± 110 en los controles frente a 310 ± 320 en los pacientes asmáticos y la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $5,4 \pm 5,5$ en los controles frente a $9,4 \pm 17,7$ en los pacientes asmáticos (Tabla 10).

Las diferencias descritas anteriormente también se observaron en los distintos grupos de pacientes asmáticos estudiados que se detallan a continuación, excepto en el caso del asma no eosinofílica, en el que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *IL5RA* respecto al grupo de controles.

Tabla 10. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de *IL5RA* en pacientes asmáticos respecto a los controles.

	N	Eosinófilos/ μ l (Mediana \pm RI)	P-valor	Expresión de <i>IL5RA</i> (Mediana \pm RI)	P-valor
Controles	100	110 \pm 110		5,4 \pm 5,5	
Pacientes	198	310 \pm 320	< 0,001	9,4 \pm 17,7	< 0,001

RI: rango intercuartílico.

a) Influencia de la atopia y la poliposis nasosinusal

El grupo de controles y el de pacientes diagnosticados de asma no alérgica presentaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA* ($P < 0,001$) (Tabla 11). La mediana de eosinófilos fue 230 ± 310 y la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $8,1 \pm 18,1$ en los pacientes con asma no alérgica. También se observaron diferencias significativas entre el grupo de controles y el de pacientes diagnosticados de asma alérgica ($P < 0,001$), en el que la mediana de eosinófilos fue 320 ± 290 y la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $10,1 \pm 17,8$. Sin embargo, no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas ni en el recuento de eosinófilos ni en los niveles de expresión de *IL5RA* entre los pacientes con asma no alérgica y los pacientes con asma alérgica.

En cuanto a la influencia de la poliposis nasosinusal, el grupo de controles y el de pacientes asmáticos presentaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA* tanto en ausencia como en presencia de poliposis nasosinusal ($P < 0,001$) (Tabla 11). La mediana de eosinófilos fue 220 ± 240 en el asma sin poliposis nasosinusal y 405 ± 445 en el asma con poliposis nasosinusal, mientras que la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $8,3 \pm 12,3$ en el asma sin poliposis nasosinusal y $10,5 \pm 21,0$ en el asma con poliposis nasosinusal. No obstante, aunque se observaron diferencias significativas en el recuento de eosinófilos entre la ausencia y la presencia de poliposis nasosinusal ($P < 0,001$), no fue así para los niveles de expresión de *IL5RA*.

Resultados

Además, respecto al grupo de controles, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA* en relación a la ausencia o presencia de poliposis nasosinusal tanto en el asma no alérgica como en el asma alérgica ($P \leq 0,001$) (Figura 37). Estas diferencias fueron menos notorias en los niveles de expresión de *IL5RA* en los pacientes con asma no alérgica sin poliposis nasosinusal ($P = 0,052$). También se observaron diferencias significativas en el recuento de eosinófilos entre la ausencia y la presencia de poliposis nasosinusal tanto en el asma no alérgica ($P = 0,018$) como en el asma alérgica ($P < 0,001$), siendo mayor la mediana de eosinófilos en los grupos con poliposis nasosinusal. No ocurrió igual con los niveles de expresión de *IL5RA*, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la ausencia y la presencia de poliposis nasosinusal ni en el asma no alérgica ni en el asma alérgica. No obstante, en el caso del asma no alérgica se observó cierta tendencia al aumento de los niveles de expresión de *IL5RA* con la presencia de poliposis nasosinusal, siendo la mediana $10,7 \pm 19,7$ frente a $6,1 \pm 6,6$ en el asma no alérgica sin poliposis nasosinusal.

Tabla 11. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de *IL5RA* según la presencia de atopía y/o poliposis nasosinusal en los pacientes asmáticos respecto a los controles.

	N	Eosinófilos/ μ l (Mediana \pm RI)	P-valor	Expresión de <i>IL5RA</i> (Mediana \pm RI)	P-valor
Controles	100	110 \pm 110		5,4 \pm 5,5	
Asma no alérgica	77	230 \pm 310	< 0,001	8,1 \pm 18,1	< 0,001
ANA sin PN	34	185 \pm 228	0,001	6,1 \pm 6,6	0,052
ANA con PN	43	350 \pm 320	< 0,001	10,7 \pm 19,7	< 0,001
Asma alérgica	121	320 \pm 290	< 0,001	10,1 \pm 17,8	< 0,001
AA sin PN	83	235 \pm 250	< 0,001	9,3 \pm 16,2	< 0,001
AA con PN	38	460 \pm 360	< 0,001	11,0 \pm 26,3	< 0,001
Asma sin PN	117	220 \pm 240	< 0,001	8,3 \pm 12,3	< 0,001
Asma con PN	81	405 \pm 445	< 0,001	10,5 \pm 21,0	< 0,001

AA: asma alérgica; ANA: asma no alérgica; PN: poliposis nasosinusal; RI: rango intercuartílico.

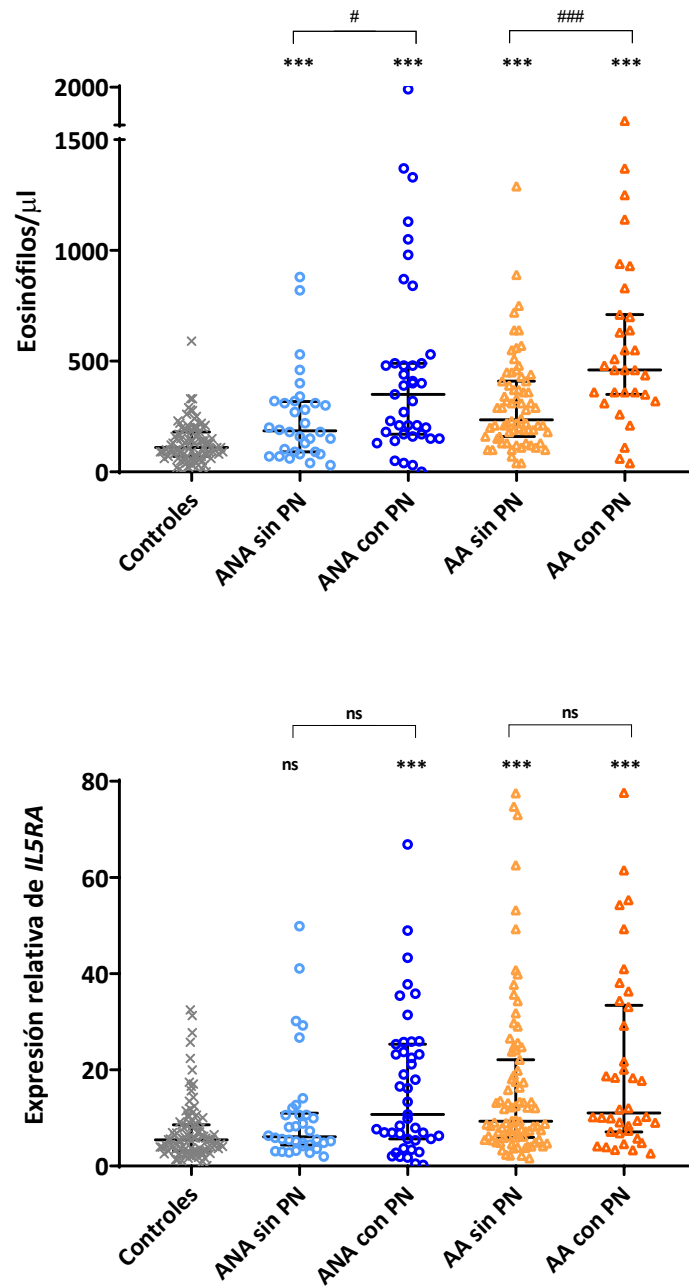


Figura 37. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de IL5RA según la presencia de atopía y/o poliposis nasosinusal en los pacientes asmáticos. Se muestra la mediana \pm rango intercuartílico. AA: asma alérgica; ANA: asma no alérgica; PN: poliposis nasosinusal. (*) Nivel de significación respecto a los controles y (#) entre los grupos de pacientes (ns: no significativo; # $P \leq 0,05$; ### $P \leq 0,001$; * $P \leq 0,001$).**

b) Inicio del asma

El grupo de controles y el de pacientes diagnosticados de asma de inicio precoz presentaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA* ($P < 0,001$) (Tabla 12). La mediana de eosinófilos fue 310 ± 263 y la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $8,6 \pm 15,7$ en los pacientes con asma de inicio precoz. También se observaron diferencias significativas entre el grupo de controles y el de pacientes diagnosticados de asma de inicio tardío ($P < 0,001$), en el que la mediana de eosinófilos fue 295 ± 345 y la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $10,0 \pm 18,6$. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas ni en el recuento de eosinófilos ni en los niveles de expresión de *IL5RA* entre los pacientes con asma de inicio precoz y asma de inicio tardío (Figura 38).

Tabla 12. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de *IL5RA* según inicio del asma en los pacientes respecto a los controles.

	N	Eosinófilos/ μ l (Mediana \pm RI)	P-valor	Expresión de <i>IL5RA</i> (Mediana \pm RI)	P-valor
Controles	100	110 \pm 110		5,4 \pm 5,5	
Asma de inicio precoz	80	310 \pm 263	< 0,001	8,6 \pm 15,7	< 0,001
Asma de inicio tardío	118	295 \pm 345	< 0,001	10,0 \pm 18,6	< 0,001

RI: rango intercuartílico.

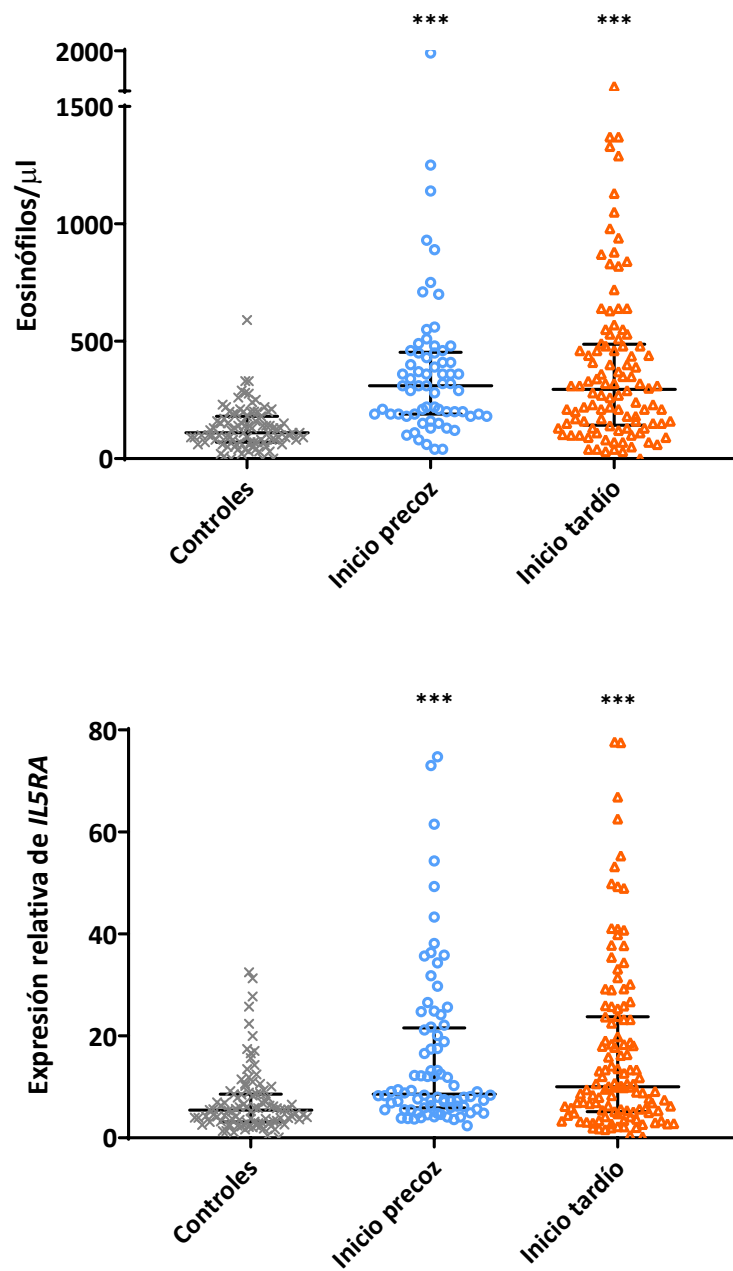


Figura 38. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de IL5RA según inicio del asma en los pacientes respecto a los controles. Se muestra la mediana \pm rango intercuartílico (***) $P \leq 0,001$.

c) Eosinofilia

El grupo de controles y el de pacientes diagnosticados de asma no eosinofílica presentaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de eosinófilos ($P = 0,011$) pero no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión de *IL5RA* (Tabla 13). La mediana de eosinófilos fue 90 ± 70 y la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $4,8 \pm 4,5$ en los pacientes con asma no eosinofílica. También se observaron diferencias significativas entre el grupo de controles y el de pacientes diagnosticados de asma eosinofílica ($P < 0,001$), en el que la mediana de eosinófilos fue 360 ± 310 y la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $12,0 \pm 19,1$. Además, hubo diferencias estadísticamente significativas tanto en el recuento de eosinófilos como en los niveles de expresión de *IL5RA* entre los pacientes con asma no eosinofílica y asma eosinofílica ($P < 0,001$) (Figura 39).

Tabla 13. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de *IL5RA* según ausencia o presencia de eosinofilia en los pacientes asmáticos respecto a los controles.

	N	Eosinófilos/ μ l (Mediana \pm RI)	P-valor	Expresión de <i>IL5RA</i> (Mediana \pm RI)	P-valor
Controles	100	110 \pm 110		5,4 \pm 5,5	
Asma no eosinofílica	35	90 \pm 70	0,011	4,8 \pm 4,5	0,316
Asma eosinofílica	135	360 \pm 310	< 0,001	12,0 \pm 19,1	< 0,001

RI: rango intercuartílico.

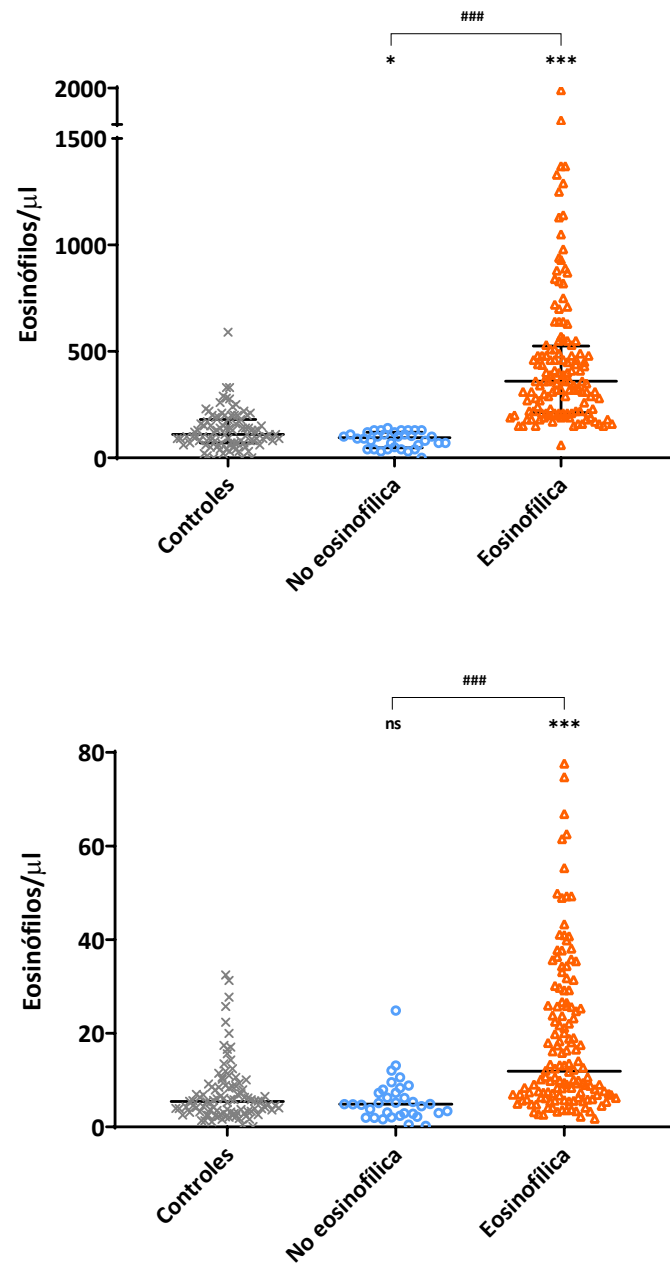


Figura 39. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de IL5RA según ausencia o presencia de eosinofilia en los pacientes asmáticos. Se muestra la mediana \pm rango intercuartílico. (*)

Nivel de significación respecto a los controles y (#) entre los grupos de pacientes

(ns: no significativo; * $P \leq 0,05$; ### $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,001$).

d) Gravedad del asma

Se observó un incremento significativo tanto en el recuento de eosinófilos como en los niveles de expresión de *IL5RA* según la gravedad del asma en los pacientes respecto a los controles ($P < 0,001$) (Tabla 14). Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de eosinófilos entre los pacientes con asma intermitente y asma persistente grave ($P = 0,010$) (Figura 40). La mediana de eosinófilos fue 280 ± 210 en el asma intermitente frente a 440 ± 660 en el asma persistente grave. No ocurrió igual con los niveles de expresión de *IL5RA*, ya que no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con asma intermitente y asma persistente grave. No obstante, se observó cierta tendencia al aumento de los niveles de expresión de *IL5RA* con la gravedad del asma, siendo en el asma intermitente los más bajos y en el asma persistente grave los más elevados, con unas medianas de $7,5 \pm 9,3$ y $16,3 \pm 30,7$ respectivamente. Así como una notable dispersión en el asma persistente leve que no se observó en el recuento de eosinófilos.

Tabla 14. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de *IL5RA* según gravedad del asma respecto a los controles.

	N	Eosinófilos/ μ l (Mediana \pm RI)	P-valor	Expresión de <i>IL5RA</i> (Mediana \pm RI)	P-valor
Controles	100	110 \pm 110		5,4 \pm 5,5	
Asma intermitente	51	280 \pm 210	< 0,001	7,5 \pm 9,3	0,001
Asma persistente leve	36	360 \pm 303	< 0,001	10,1 \pm 27,0	< 0,001
Asma persistente moderada	83	265 \pm 303	< 0,001	9,1 \pm 14,2	< 0,001
Asma persistente grave	27	440 \pm 660	< 0,001	16,3 \pm 30,7	< 0,001

RI: rango intercuartílico.

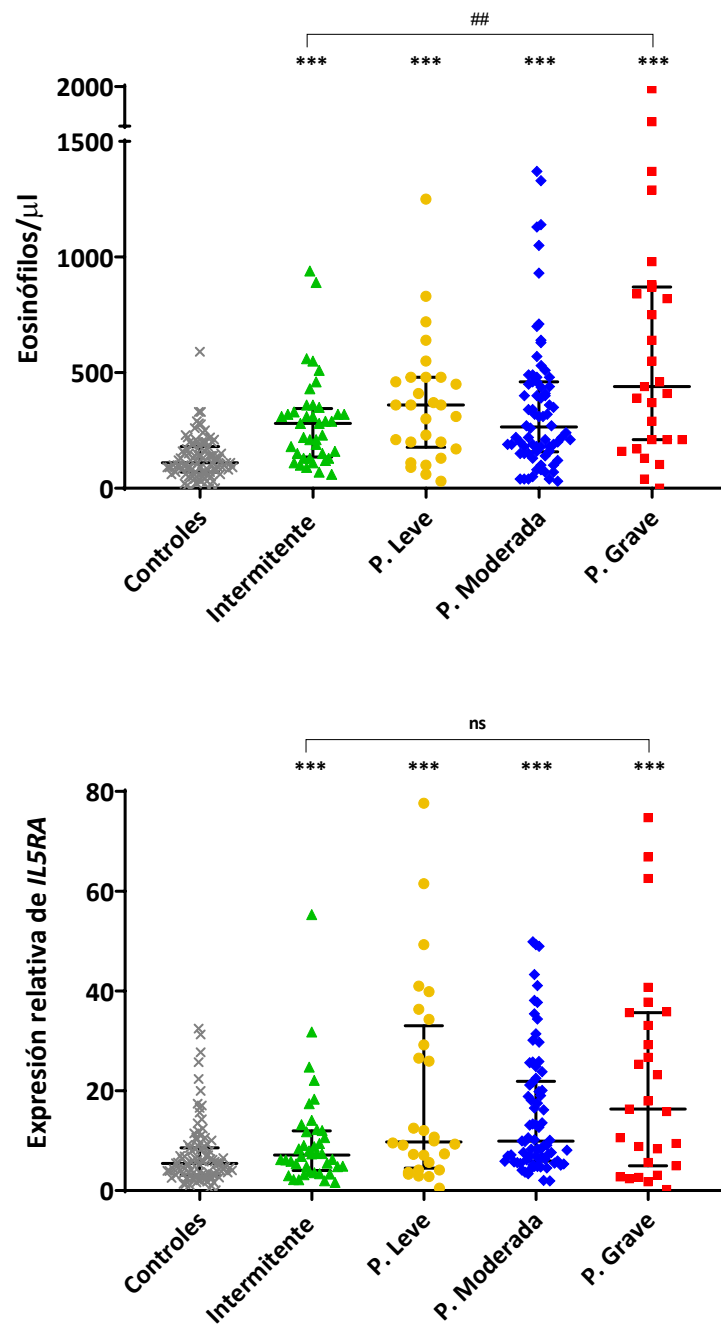


Figura 40. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de IL5RA según gravedad del asma.

Se muestra la mediana \pm rango intercuartílico. (*) Nivel de significación respecto a los controles y (#) entre el asma intermitente y el asma persistente grave (ns: no significativo; ## $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

e) Sensibilización alérgica

Se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en el recuento de eosinófilos como en los niveles de expresión de *IL5RA* en los pacientes asmáticos monosensibilizados respecto al grupo de controles ($P < 0,001$) (Tabla 15). La mediana de eosinófilos fue 375 ± 348 y la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $10,0 \pm 26,4$ en los pacientes monosensibilizados. Estas diferencias también se observaron en el grupo de pacientes polisensibilizados ($P < 0,001$), en el que la mediana de eosinófilos fue 310 ± 280 y la mediana de los niveles de expresión de *IL5RA* fue $10,2 \pm 13,7$. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas ni en el recuento de eosinófilos ni en los niveles de expresión de *IL5RA* entre los pacientes asmáticos monosensibilizados y los polisensibilizados.

En cuanto a los grupos de aeroalérgenos, se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en el recuento de eosinófilos como en los niveles de expresión de *IL5RA* entre el grupo de controles y los pacientes con pruebas cutáneas positivas a pólenes, ácaros, epitelios u hongos ($P < 0,001$) También se observaron diferencias significativas en el recuento de eosinófilos y en los niveles de expresión de *IL5RA* entre el grupo de controles y los pacientes monosensibilizados a pólenes ($P < 0,001$). Las medianas en este caso fueron las más elevadas, con valores de 410 ± 250 en el recuento de eosinófilos y $17,8 \pm 29,4$ en los niveles de expresión de *IL5RA*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *IL5RA* en los pacientes monosensibilizados a ácaros o epitelios, aunque sí se observaron en el recuento de eosinófilos ($P = 0,030$ y $P = 0,014$ respectivamente).

Tabla 15. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de IL5RA según la sensibilización alérgica en los pacientes asmáticos respecto a los controles.

	N	Eosinófilos/ μ l (Mediana \pm RI)	P-valor	Expresión de IL5RA (Mediana \pm RI)	P-valor
Controles	100	110 \pm 110		5,4 \pm 5,5	
Monosensibilizados	40	375 \pm 348	< 0,001	10,0 \pm 26,4	< 0,001
MS a pólenes	23	410 \pm 250	< 0,001	17,8 \pm 29,4	< 0,001
MS a ácaros	10	260 \pm 455	0,030	9,2 \pm 18,2	0,093
MS a epitelios	7	400 \pm 603	0,014	8,3 \pm 72,6	0,078
Polisensibilizados	81	310 \pm 280	< 0,001	10,2 \pm 13,7	< 0,001
PC (+) a pólenes	96	360 \pm 290	< 0,001	12,0 \pm 17,7	< 0,001
PC (+) a ácaros	51	310 \pm 345	< 0,001	9,5 \pm 12,0	< 0,001
PC (+) a epitelios	74	310 \pm 270	< 0,001	11,0 \pm 16,5	< 0,001
PC (+) a hongos	26	300 \pm 268	< 0,001	8,3 \pm 12,0	0,001

MS: monosensibilizados; PC (+): pruebas cutáneas positivas; RI: rango intercuartílico.

f) Hipersensibilidad a los AINE y EREA

Se observó un incremento significativo tanto en el recuento de eosinófilos como en los niveles de expresión de IL5RA en los pacientes sin hipersensibilidad a los AINE respecto a los controles ($P < 0,001$) (Tabla 16). La mediana de eosinófilos fue 300 ± 320 y la mediana de los niveles de expresión de IL5RA fue $9,5 \pm 18,2$ en los pacientes sin hipersensibilidad a los AINE. Estas diferencias también se observaron en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE respiratoria ($P < 0,001$), en los que la mediana de eosinófilos fue 270 ± 270 y la mediana de los niveles de expresión de IL5RA fue $9,9 \pm 14,2$; y en los pacientes con hipersensibilidad a los AINE cutánea, en los que la mediana de eosinófilos fue 345 ± 250 ($P < 0,001$) y la mediana de los niveles de expresión de IL5RA fue $9,9 \pm 13,5$ ($P = 0,024$). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas ni en el recuento de eosinófilos ni en los niveles de expresión de IL5RA entre los pacientes con hipersensibilidad a los AINE respecto a los pacientes sin hipersensibilidad a los AINE.

Tabla 16. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de IL5RA según la hipersensibilidad a los AINE en los pacientes asmáticos respecto a los controles.

	N	Eosinófilos/ μ l (Mediana \pm RI)	P-valor	Expresión de IL5RA (Mediana \pm RI)	P-valor
Controles	100	110 \pm 110		5,4 \pm 5,5	
Sin hAINE	160	300 \pm 320	<0,001	9,5 \pm 18,2	<0,001
hAINE respiratoria	29	270 \pm 270	<0,001	9,9 \pm 14,2	<0,001
hAINE cutánea	9	345 \pm 250	<0,001	9,9 \pm 13,5	0,024

hAINE: hipersensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos; RI: rango intercuartílico.

En cuanto a la presencia de EREA, se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en el recuento de eosinófilos como en los niveles de expresión de IL5RA en los pacientes sin EREA respecto a los controles ($P < 0,001$) (Tabla 17). La mediana de eosinófilos fue 300 ± 320 y la mediana de los niveles de expresión de IL5RA fue $9,0 \pm 18,2$ en los pacientes sin EREA. Estas diferencias también se observaron en los pacientes con EREA sin alergia, en los que la mediana de eosinófilos fue 190 ± 255 ($P = 0,002$) y la mediana de los niveles de expresión de IL5RA fue $8,3 \pm 15,3$; y en los pacientes con EREA y alergia, en los que la mediana de eosinófilos fue 360 ± 290 ($P < 0,001$) y la mediana de los niveles de expresión de IL5RA fue $12,0 \pm 24,0$ ($P = 0,001$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ni en el recuento de eosinófilos ni en los niveles de expresión de IL5RA entre los pacientes con EREA y los pacientes sin EREA, aunque se observó cierta tendencia al aumento en los pacientes con EREA y alergia.

Tabla 17. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de IL5RA según presencia de EREA en los pacientes asmáticos respecto a los controles.

	N	Eosinófilos/ μ l (Mediana \pm RI)	P-valor	Expresión de IL5RA (Mediana \pm RI)	P-valor
Controles	100	110 \pm 110		5,4 \pm 5,5	
Asma sin EREA	176	300 \pm 320	<0,001	9,0 \pm 18,2	<0,001
EREA sin alergia	14	190 \pm 255	0,002	8,3 \pm 15,3	0,043
EREA con alergia	8	360 \pm 290	<0,001	12,0 \pm 24,0	0,001

EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por los antiinflamatorios no esteroideos; RI: rango intercuartílico.

g) Tratamiento con glucocorticoides e inmunoterapia

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en el recuento de eosinófilos ni en los niveles de expresión de *IL5RA* entre los pacientes que recibían tratamiento con glucocorticoides inhalados respecto a los pacientes que no los recibían (Tabla 18). La mediana de eosinófilos fue 310 ± 260 en los pacientes sin tratamiento frente a 310 ± 330 en los pacientes tratados con glucocorticoides inhalados y las medianas de los niveles de expresión de *IL5RA* fueron $8,9 \pm 16,8$ y $9,9 \pm 17,9$ respectivamente. Tampoco se observaron diferencias significativas ni en el recuento de eosinófilos ni en los niveles de expresión de *IL5RA* entre los pacientes que recibían inmunoterapia específica con alérgenos respecto a los pacientes que no la recibían. La mediana de eosinófilos fue 300 ± 325 en los pacientes que no recibían inmunoterapia frente a 350 ± 280 en los pacientes que la recibían y las medianas de los niveles de expresión de *IL5RA* fueron $9,4 \pm 18,0$ y $9,5 \pm 14,7$ respectivamente.

Tabla 18. Recuento de eosinófilos y niveles de expresión relativa de *IL5RA* según tratamiento con glucocorticoides inhalados o inmunoterapia específica con alérgenos respecto a los pacientes sin tratamiento.

	N	Eosinófilos/ μ l (Mediana \pm RI)	P-valor	Expresión de <i>IL5RA</i> (Mediana \pm RI)	P-valor
Sin glucocorticoides inhalados	62	310 ± 260		$8,9 \pm 16,8$	
Con glucocorticoides inhalados	135	310 ± 330	0,958	$9,9 \pm 17,9$	0,893
Sin inmunoterapia	142	300 ± 325		$9,4 \pm 18,0$	
Con inmunoterapia	55	350 ± 280	0,557	$9,5 \pm 14,7$	0,854

RI: rango intercuartílico.

4.2.3. Estudio de correlación entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA*

Se analizó la relación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de *IL5RA* en la población a estudio, obteniéndose una correlación positiva moderada ($\rho = 0,638$; $P < 0,001$). Los coeficientes de correlación en los diferentes grupos estudiados se muestran en la tabla 19. Se observó una correlación

Resultados

positiva débil en el grupo de controles mientras que, en general, en los diferentes grupos de pacientes las correlaciones fueron positivas moderadas, siendo la correlación más elevada en el grupo de asma de inicio tardío ($\rho = 0,638$; $P < 0,001$), destacando también el asma con poliposis nasosinusal ($\rho = 0,617$; $P < 0,001$) y el asma no alérgica ($\rho = 0,614$; $P < 0,001$).

Dado que los basófilos también expresan *IL5RA*, se analizó igualmente la relación entre el recuento de basófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de *IL5RA* en la población a estudio, obteniéndose una correlación positiva débil ($\rho = 0,318$; $P < 0,001$). Tal y como se observa en la tabla 19, no existe correlación ni en el grupo de controles ni en algunos grupos de pacientes, como el asma sin poliposis nasosinusal o el asma de inicio precoz. Tampoco se observaron cambios en el coeficiente de correlación al estudiar la relación entre el recuento de eosinófilos y basófilos en conjunto y los niveles de expresión relativa de *IL5RA*, siendo similar a lo observado en el caso del recuento de eosinófilos. Además, se analizó la relación de los niveles de expresión relativa de *IL5RA* con otros tipos celulares, obteniéndose una ausencia de correlación en el caso de los linfocitos ($\rho = 0,073$; $P = 0,261$; datos no mostrados) y una correlación negativa débil en el caso de los neutrófilos ($\rho = -0,179$; $P = 0,006$) que se observó únicamente en algunos grupos de pacientes (Tabla 19).

Por otro lado, destacó la existencia de individuos que, con el mismo recuento de eosinófilos, presentaron valores muy variables en cuanto a los niveles de expresión de *IL5RA* (Figura 41). Por ejemplo, para recuentos de 200 eosinófilos/ μl se observaron niveles de expresión de *IL5RA* comprendidos entre 4 y 32 *fold change*. También ocurrió lo mismo al contrario, es decir, individuos con similares niveles de expresión de *IL5RA* presentaron diferente recuento de eosinófilos. Por ejemplo, para niveles de expresión de *IL5RA* próximos a 7 *fold change* se observaron recuentos de eosinófilos comprendidos entre 60 y 700/ μl .

Tabla 19. Coeficientes de correlación de Spearman entre el recuento de eosinófilos, basófilos y neutrófilos con los niveles de expresión de IL5RA en el grupo de controles y los diferentes grupos de pacientes.

	Expresión de IL5RA			
	Eosinófilos	Basófilos	Eosinófilos + Basófilos	Neutrófilos
Controles	0,439*	0,084	0,420*	0,088
Pacientes	0,605*	0,287*	0,618*	-0,190*
Asma no alérgica	0,614*	0,351*	0,608*	-0,094
Asma alérgica	0,585*	0,200*	0,588*	-0,221*
Asma sin PN	0,557*	0,085	0,551*	-0,201*
Asma con PN	0,617*	0,364*	0,617*	-0,115
Asma de inicio precoz	0,516*	0,093	0,506*	-0,151
Asma de inicio tardío	0,638*	0,361*	0,640*	-0,156
Asma no eosinofílica	0,412*	0,084	0,397*	-0,007
Asma eosinofílica	0,551*	0,262*	0,550*	-0,197*
Asma intermitente	0,483*	-0,007	0,463*	-0,071
Asma persistente grave	0,560*	0,236*	0,563*	-0,104

PN: poliposis nasosinusal; * Grupos en los que se observan diferencias significativas.

Además, al representar el recuento de eosinófilos en cuartiles (Figura 42), se observó un incremento dependiente del recuento de eosinófilos tanto en los niveles de expresión de IL5RA como en la dispersión, obteniéndose diferencias significativas entre los diferentes cuartiles ($P < 0,001$). Así, la mediana de los niveles de expresión de IL5RA fue de $4,8 \pm 3,8$ en el cuartil 1, donde se encontraban los recuentos más bajos de eosinófilos, y aumentó progresivamente en los cuartiles 2 y 3. Destaca el cuartil 4, donde se encontraban los recuentos más altos de eosinófilos y en el que el incremento de la mediana de los niveles de expresión de IL5RA se triplicó, alcanzando un valor de $25,7 \pm 25,1$

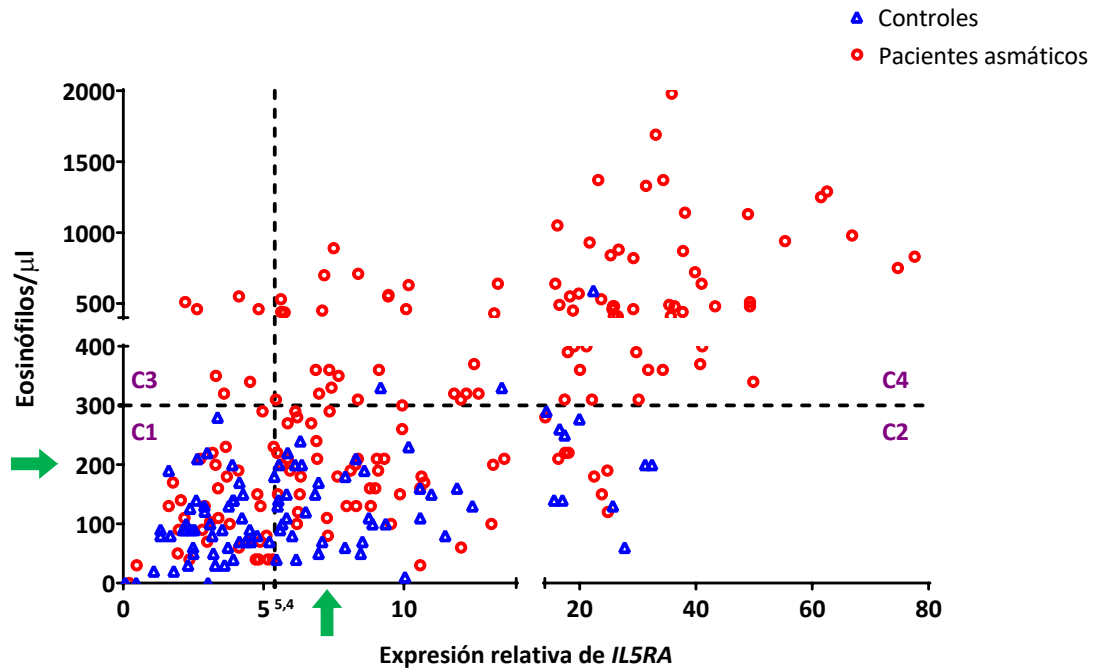


Figura 41. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de IL5RA del grupo de controles y el grupo de pacientes asmáticos en el estudio de validación. Se representan los cuatro cuadrantes (C1-C4) obtenidos al dividir según los valores de normalidad para el recuento de eosinófilos (300/ μ l) y los niveles de expresión de IL5RA (5,4 fold change). Las flechas verdes indican un valor constante de eosinófilos para el que se observan diferentes valores de expresión de IL5RA, y viceversa.

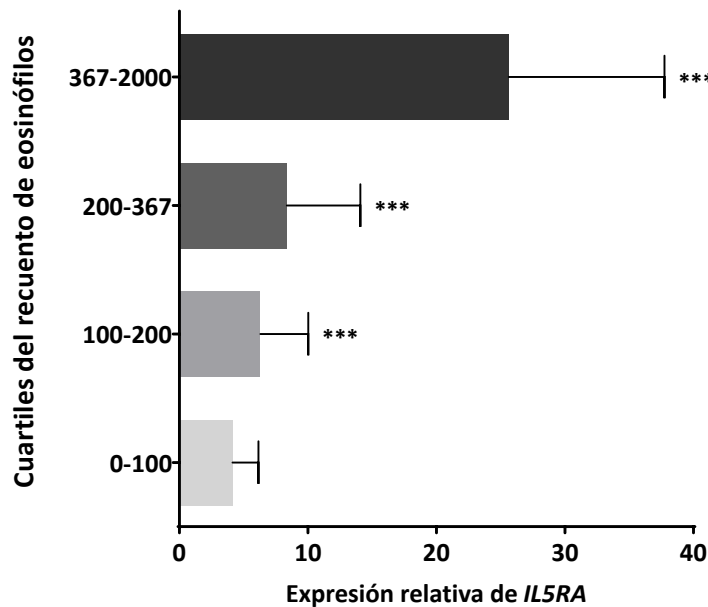


Figura 42. Niveles de expresión de IL5RA en los cuartiles del recuento de eosinófilos de la población en el estudio de validación. Se muestra la mediana \pm rango intercuartílico y el nivel de significación respecto al cuartil 1 (***) ($P \leq 0,001$).

En cuanto a la distribución en los diferentes cuadrantes (Figura 41), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de controles y el grupo de pacientes asmáticos ($P < 0,001$). Todos los controles, excepto tres, tuvieron un recuento de eosinófilos normal, observándose dos poblaciones en el grupo de controles. El 48,4 % de los controles que presentaron niveles normales de expresión de *IL5RA* se localizó en el cuadrante 1 y el 48,4 % de los controles que presentaron niveles elevados de expresión de *IL5RA* se localizó en el cuadrante 2. A su vez, los pacientes mostraron una alta dispersión en los niveles de expresión de *IL5RA*, que fue más destacada en aquellos pacientes con elevado recuento de eosinófilos. Aunque existía cierta correlación entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA*, hubo pacientes con un recuento de eosinófilos normal y niveles elevados de expresión de *IL5RA*, y viceversa. Estos pacientes representaron el 33,5 % y se localizaron en los cuadrantes 2 y 3. Al contrario que en el grupo de controles, aproximadamente la mitad de los pacientes (46,5 %) presentaron elevación tanto del recuento de eosinófilos como de los niveles de expresión de *IL5RA*, localizándose en el cuadrante 4, mientras que solo un 20 % con valores normales se localizó en el cuadrante 1. Todos los datos de la distribución de la población a estudio en los diferentes cuadrantes se muestran en la tabla 20. Los diferentes grupos de pacientes asmáticos estudiados se detallan a continuación.

a) Atopia

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución en cuadrantes entre los pacientes con asma no alérgica y asma alérgica. Aproximadamente un tercio de los pacientes de ambos grupos presentó discordancias en el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA*, localizándose en los cuadrantes 2 y 3. Además, el 45 % de los pacientes de ambos grupos presentó elevación del recuento de eosinófilos y de los niveles de expresión de *IL5RA*, localizándose en el cuadrante 4, mientras que solo un 20 % con valores normales se localizó en el cuadrante 1 (Figura 43), tal y como se ha descrito previamente.

Tabla 20. Distribución en los cuatro cuadrantes del grupo de controles y los diferentes grupos de pacientes. Los cuadrantes (C1-C4) se obtuvieron según los valores de normalidad para el recuento de eosinófilos (300/ μ l) y los niveles de expresión de IL5RA (5,4 fold change). Los datos se muestran en porcentajes.

	C1	C2	C3	C4	P-valor*
Controles (N = 95)	48,4	48,4	0,0	3,2	
Pacientes (N = 170)	20,0	29,4	4,1	46,5	< 0,001
Asma no alérgica (N = 71)	26,8	29,6	2,8	40,8	
Asma alérgica (N = 99)	15,2	29,3	5,0	50,5	0,250
Asma sin PN (N = 100)	21,0	40,0	5,0	34,0	
Asma con PN (N = 70)	18,6	14,3	2,8	64,3	< 0,001
Asma intermitente (N = 40)	25,0	32,5	10,0	32,5	
Asma persistente leve (N = 28)	21,4	21,4	3,6	53,6	
Asma persistente moderada (N = 74)	16,2	36,5	1,4	45,9	
Asma persistente grave (N = 27)	22,2	14,8	3,7	59,3	0,137

C: cuadrante; PN: poliposis nasosinusal; *P-valor obtenido de la comparación entre los grupos de controles vs. pacientes; asma no alérgica vs. asma alérgica; asma sin PN vs. asma con PN; y asma intermitente vs. asma persistente grave, respectivamente.

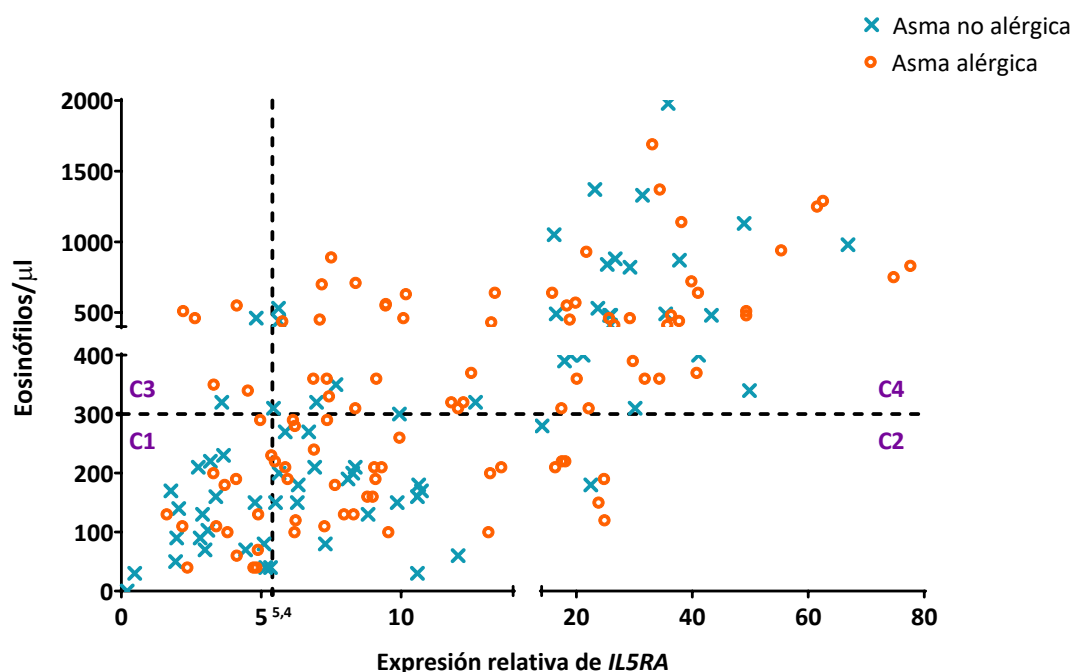


Figura 43. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de IL5RA de los pacientes con asma no alérgica y asma alérgica en el estudio de validación. Se representan los cuatro cuadrantes (C1-C4) obtenidos al dividir según los valores de normalidad para el recuento de eosinófilos (300/ μ l) y los niveles de expresión de IL5RA (5,4 fold change).

b) Poliposis nasosinusal

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución en cuadrantes entre la ausencia y la presencia de poliposis nasosinusal en los pacientes asmáticos ($P < 0,001$). El 20 % de los pacientes de ambos grupos se localizó en el cuadrante 1, encontrándose las diferencias, por tanto, en el resto de los cuadrantes. El 45 % de los pacientes asmáticos sin poliposis nasosinusal presentó discordancias en el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA*, localizándose en los cuadrantes 2 y 3, mientras que solamente el 17,1 % de los pacientes asmáticos con poliposis nasosinusal se localizó en dichos cuadrantes. Además, los pacientes asmáticos con poliposis nasosinusal que tuvieron elevados tanto el recuento de eosinófilos como los niveles de expresión de *IL5RA*, localizados en el cuadrante 4, supusieron el doble que los pacientes asmáticos sin poliposis nasosinusal, un 64,3 % frente a un 34 % respectivamente (Figura 44).

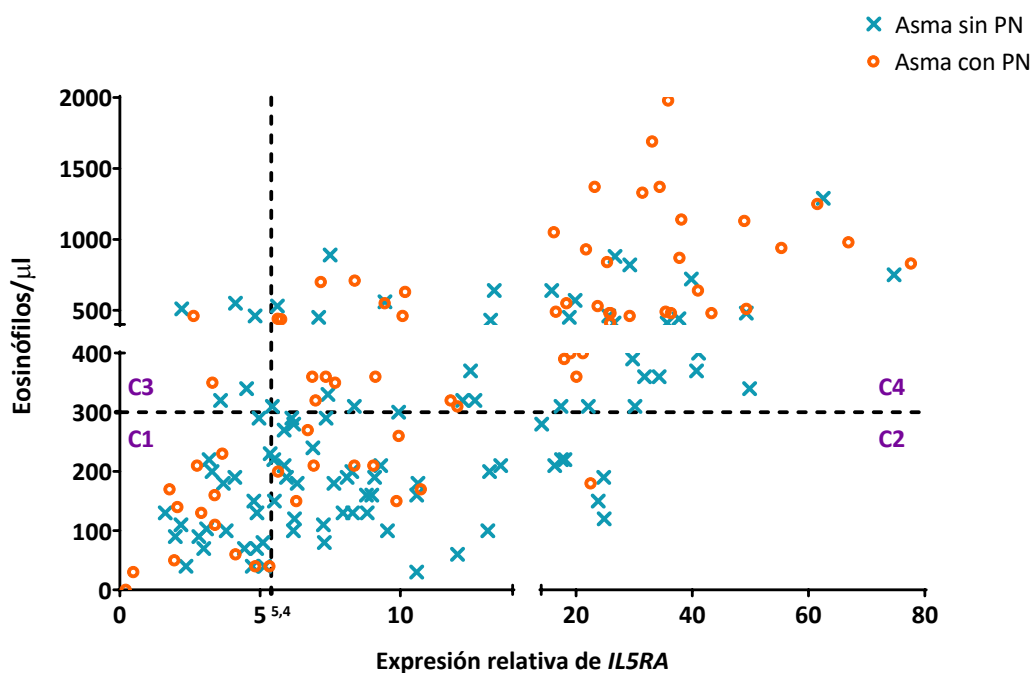


Figura 44. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de *IL5RA* de los pacientes con asma en ausencia o presencia de poliposis nasosinusal en el estudio de validación. Se representan los cuatro cuadrantes (C1-C4) obtenidos al dividir según los valores de normalidad para el recuento de eosinófilos (300/ μ l) y los niveles de expresión de *IL5RA* (5,4 fold change). PN: poliposis nasosinusal.

c) Gravedad del asma

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la distribución en cuadrantes entre los pacientes con asma intermitente y asma persistente grave (Figura 45). No obstante, mientras que la distribución del asma intermitente fue más equilibrada entre los diferentes cuadrantes, más de la mitad (59,3 %) de los pacientes con asma persistente grave presentó elevación del recuento de eosinófilos y de los niveles de expresión de *IL5RA*, localizándose en el cuadrante 4.

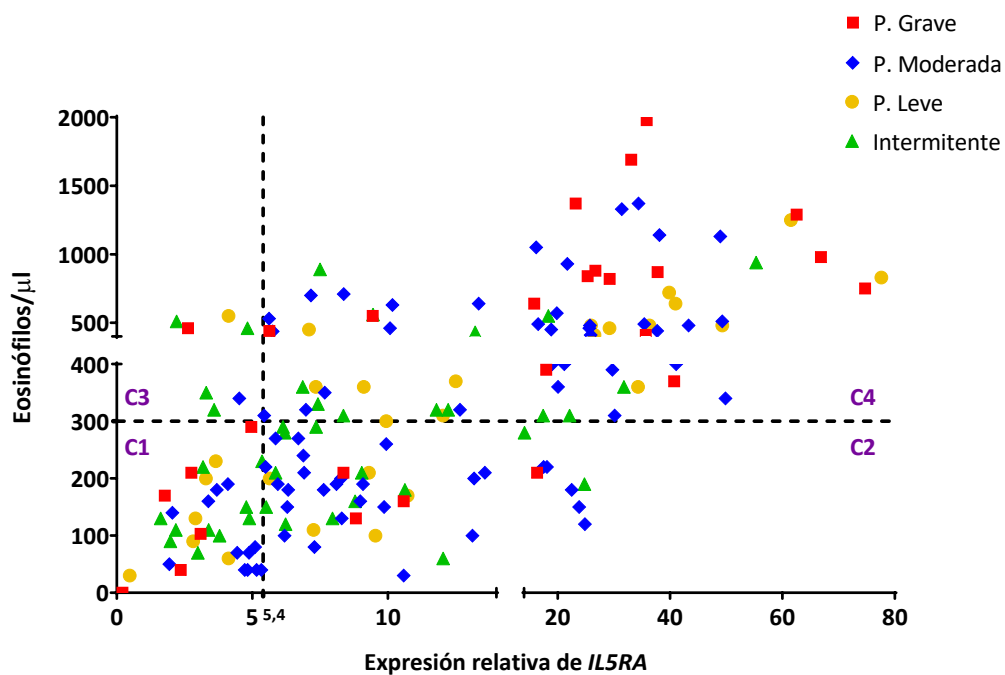


Figura 45. Correlación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de *IL5RA* en función de la gravedad del asma en el estudio de validación. Se representan los cuatro cuadrantes (C1-C4) obtenidos al dividir según los valores de normalidad para el recuento de eosinófilos (300/ μ l) y los niveles de expresión de *IL5RA* (5,4 fold change).

4.2.4. Aplicación clínica de *IL5RA* mediante el análisis de curvas ROC

Para analizar los niveles de expresión de *IL5RA* respecto a su posible aplicación clínica en el asma se realizó una curva ROC. Primero, se analizó su capacidad para diferenciar a los pacientes asmáticos de los controles (Figura 46), obteniéndose un AUC de 0,704 con un IC₉₅ % (0,641-0,767) y un error estándar de 0,032 (Tabla 21). El análisis de dicha curva proporcionó un posible punto de corte de 7 fold change para los niveles

de expresión de *IL5RA*, obteniéndose un 65,2 % de sensibilidad, un 69 % de especificidad, un 80,6 % de valor predictivo positivo y un 50 % de valor predictivo negativo. De la misma manera se realizó para el recuento de eosinófilos, obteniéndose un AUC de 0,811 con un $IC_{95\%}$ (0,760-0,861) y un error estándar de 0,026. En este caso el punto de corte obtenido fue 205/ μ l, para el cual se alcanzó un 64,7 % de sensibilidad, un 85,3 % de especificidad, un 88,7 % de valor predictivo positivo y un 57,4 % de valor predictivo negativo. Estos parámetros fueron ligeramente menores para la expresión de *IL5RA* que para el recuento de eosinófilos, destacando sobre todo la mayor exactitud, reflejada según el valor de AUC, y la mayor especificidad de este último.

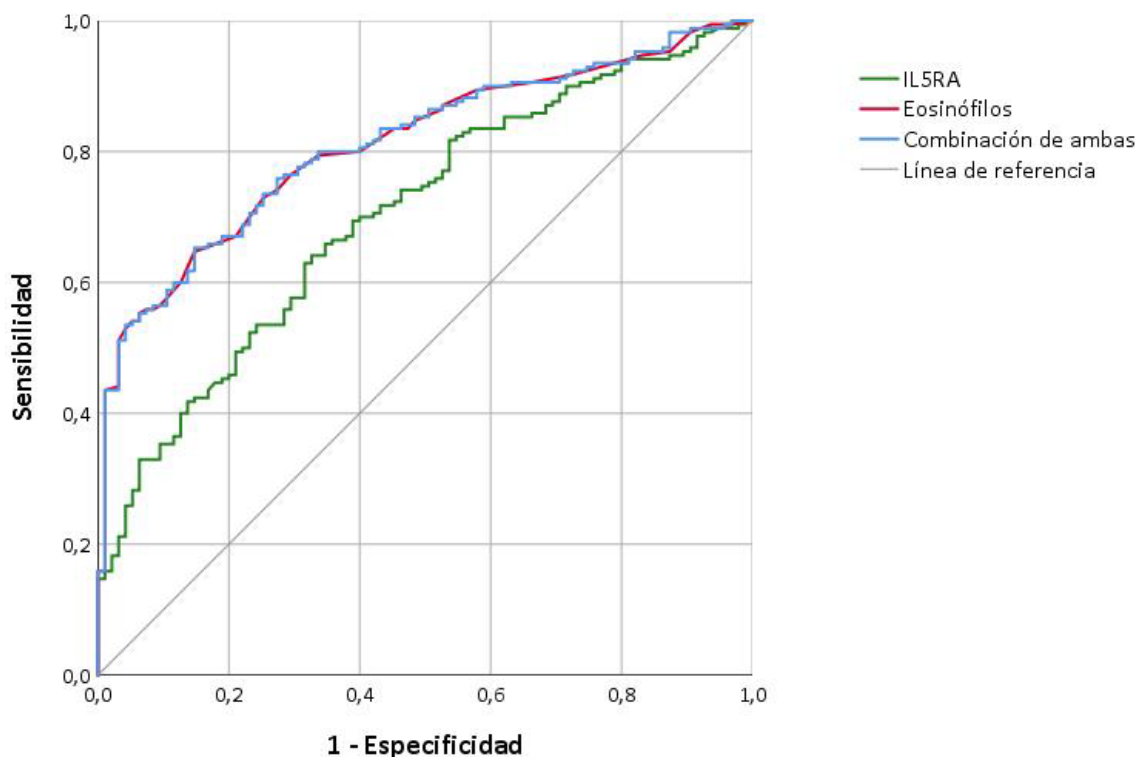


Figura 46. Representación de la curva ROC para los niveles de expresión relativa de *IL5RA*, el recuento de eosinófilos y la combinación de ambas variables en los pacientes asmáticos respecto a los controles.

A continuación, se examinó la posible combinación entre ambas variables mediante un modelo de regresión logística. Éste resultó significativo teniendo en cuenta la interacción entre ellas ($P = 0,003$), por lo que podrían usarse en conjunto. En este caso, para la curva ROC resultante (Figura 46) se obtuvo un AUC de 0,811 con un $IC_{95\%}$

Resultados

(0,761-0,862) y un error estándar de 0,026. Utilizando en conjunto los puntos de corte descritos anteriormente para ambas variables se obtuvo un 77,6 % de sensibilidad, un 62,1 % de especificidad, un 78,6 % de valor predictivo positivo y un 60,8 % de valor predictivo negativo. Destaca el aumento de la sensibilidad y el valor predictivo negativo, mientras que la especificidad y el valor predictivo positivo resultaron menores.

Finalmente, se analizó el potencial como biomarcador en los diferentes grupos de pacientes asmáticos tanto de los niveles de expresión de *IL5RA* como del recuento de eosinófilos y la combinación de ambas variables, obteniéndose los datos que se muestran en la tabla 21. En general, los resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente, sin observarse grandes diferencias entre los subgrupos, excepto en el caso del asma no eosinofílica en el que los valores de AUC indicaron la ausencia de exactitud.

Tabla 21. Análisis de la curva ROC para los niveles de expresión relativa de *IL5RA*, el recuento de eosinófilos y la combinación de ambas variables en los grupos de pacientes asmáticos respecto a los controles.

	AUC (IC ₉₅ %)		
	Eosinófilos	Expresión de <i>IL5RA</i>	Combinación
Pacientes	0,811 (0,760-0,861)	0,704 (0,641-0,767)	0,811 (0,761-0,862)
Asma no alérgica	0,761 (0,683-0,838)	0,659 (0,574-0,744)	0,762 (0,685-0,840)
Asma alérgica	0,846 (0,792-0,901)	0,737 (0,668-0,806)	0,846 (0,792-0,901)
Asma sin PN	0,774 (0,710-0,839)	0,688 (0,614-0,761)	0,774 (0,710-0,839)
Asma con PN	0,862 (0,798-0,926)	0,728 (0,647-0,809)	0,864 (0,801-0,927)
Asma no eosinofílica	0,354 (0,259-0,449)	0,436 (0,325-0,548)	0,359 (0,264-0,454)
Asma eosinofílica	0,925 (0,891-0,958)	0,771 (0,711-0,831)	0,924 (0,891-0,958)
Asma intermitente	0,804 (0,722-0,886)	0,605 (0,501-0,709)	0,807 (0,726-0,888)
Asma persistente grave	0,856 (0,754-0,958)	0,724 (0,591-0,857)	0,857 (0,757-0,957)

AUC: área bajo la curva; IC₉₅ %: intervalo de confianza al 95 %; PN: poliposis nasosinusal.

4.3. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO

4.3.1. Características de la población a estudio

En este estudio se han analizado un total de 11 pacientes diagnosticados de asma que comenzaron tratamiento con benralizumab y que habían sido incluidos previamente en el estudio de validación. Tal y como se muestra en la tabla 22, la distribución por sexos estuvo ligeramente desplazada hacia el sexo masculino, que supuso el 54,5 % de los pacientes frente al 45,5 % correspondiente al sexo femenino. La media de edad fue de 55 años (DE = 11), siendo todos los pacientes de edad similar excepto la paciente 4, que presentaba una edad menor (29 años). La mediana de los niveles séricos de IgE fue de 246 kU/L (RI = 660,9).

Tabla 22. Características de la población en el estudio farmacogenético.

	N	Sexo (%)		Edad (años)	IgE (kU/L)
		F	M	(Media ± DE)	(Mediana ± RI)
Pacientes	11	45,5	54,5	55 ± 11	246,0 ± 660,9

DE: desviación estándar; F: femenino; M: masculino; RI: rango intercuartílico.

Todos los pacientes presentaron asma eosinofílica persistente grave de inicio tardío y varios años de evolución, no controlada con altas dosis de glucocorticoides y bromuro de tiotropio. Las características de cada paciente en función de la presencia de atopia, poliposis nasosinusal, tratamiento previo y otras características se muestran en la tabla 23.

a) Influencia de la atopia y la poliposis nasosinusal

El 54,5 % de los pacientes estudiados presentó atopia, siendo igual la proporción entre el asma alérgica sin poliposis nasosinusal y el asma alérgica con poliposis nasosinusal. Por otro lado, el 45,5 % de los pacientes asmáticos no presentó atopia, suponiendo el asma no alérgica con poliposis nasosinusal una proporción ligeramente mayor que el asma no alérgica sin poliposis nasosinusal (Figura 47).

Tabla 23. Características clínicas de cada paciente asmático en el estudio farmacogenético.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Atopia	Poliposis nasosinusal	Tratamiento previo	Otras características
1	M	66	No	Si	GCO diarios	Exfumador
2	M	63	No	No	GCO rescate	Exfumador e hAINE
3	M	51	Pólenes	Si	Omalizumab y Mepolizumab	
4	F	29	Pólenes	No		
5	F	51	Pólenes	Si	Mepolizumab	EREA y GEPA
6	M	60	No	Si	Omalizumab	Exfumador
7	M	60	Ácaros	Si	GCO rescate	Exfumador y EREA
8	F	65	No	No		
9	M	47	Pólenes, Epitelios y Hongos	No		
10	F	52	No	Si	GCO rescate	
11	F	58	Pólenes y Epitelios	No	GCO rescate	

GEPA: granulomatosis eosinofílica con poliangéitís; EREA: enfermedad respiratoria exacerbada por los antiinflamatorios no esteroideos; GCO: glucocorticoides orales; hAINE: hipersensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos; F: femenino; M: masculino.

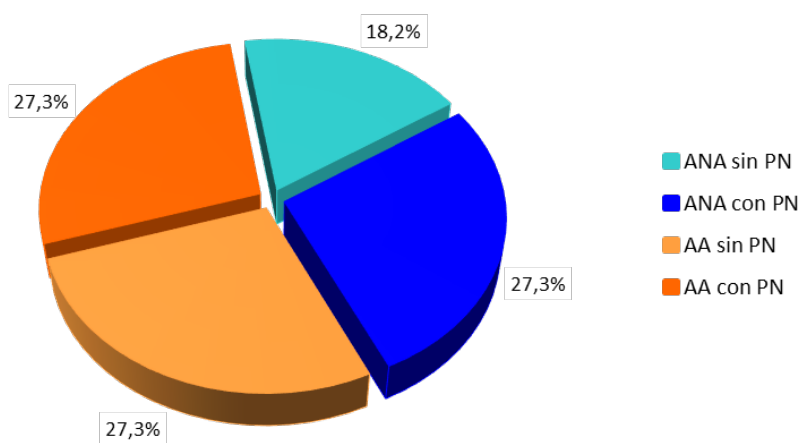


Figura 47. Distribución de los pacientes según la clasificación del asma por atopia y/o poliposis nasosinusal en el estudio farmacogenético. AA: asma alérgica; ANA: asma no alérgica; PN: poliposis nasosinusal.

b) Sensibilización alérgica

Entre los pacientes diagnosticados de atopia, el 66,6 % presentó monosensibilización, predominando la monosensibilización a pólenes (75 %) frente a ácaros (Figura 48).

En general, el grupo de aeroalérgenos para el que se observó más frecuentemente sensibilización fue el de los pólenes (83,3 %), seguido de epitelios (33,3 %), ácaros (16,7 %) y hongos (16,7 %).

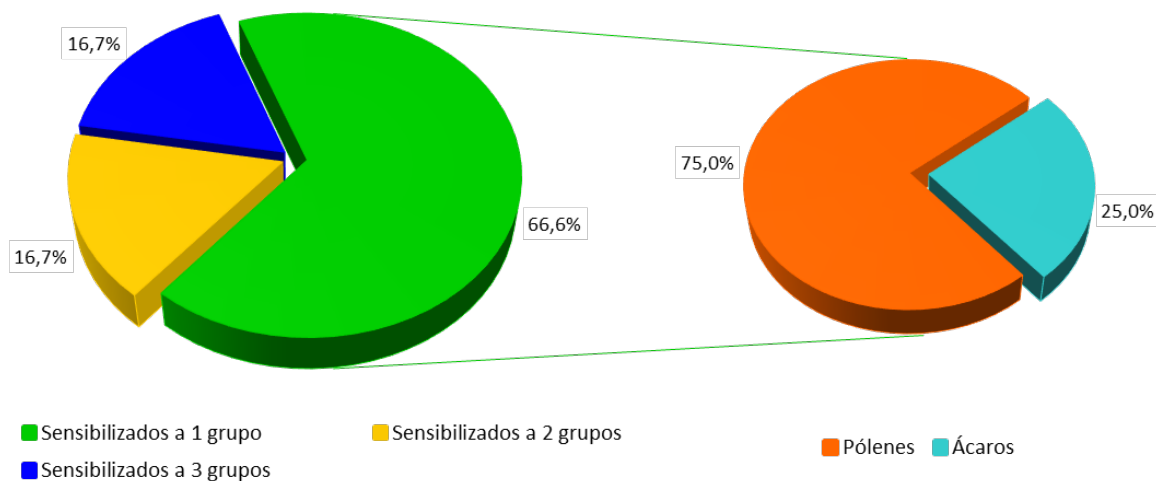


Figura 48. Distribución de los pacientes según la sensibilización alérgica y los aeroalérgenos en monosensibilizados en el estudio farmacogenético.

c) Tratamiento previo

Todos los pacientes recibían tratamiento con altas dosis de glucocorticoides inhalados y bromuro de tiotropio para el control de la enfermedad. Además, algunos pacientes también precisaban tratamiento con glucocorticoides orales, siendo diarios en el caso del paciente 1 y de rescate en el caso de los pacientes 2, 7, 10 y 11.

En cuanto a las terapias biológicas, tres de los pacientes estudiados ya habían recibido previamente tratamiento con otros fármacos antes de empezar con benralizumab. Concretamente, el paciente 3 había sido tratado primero con omalizumab y después con mepolizumab, sin mostrar mejoría con ninguno de los

fármacos y presentando cuatro reagudizaciones durante el tratamiento; el paciente 5 había sido tratado con mepolizumab, presentando buena respuesta, pero mala tolerancia al tratamiento; y el paciente 6 había sido tratado con omalizumab, presentando buena respuesta para el asma, pero mala respuesta en el caso de la poliposis nasosinusal.

4.3.2. Tratamiento con benralizumab

En primer lugar, para valorar la estabilidad de los niveles de expresión de *IL5RA*, se analizaron dos muestras de un paciente no tratado con glucocorticoides orales ni con terapias biológicas, separadas ambas por un periodo de tiempo de un año. No se observaron diferencias importantes en los niveles de expresión de *IL5RA* (13,1 *fold change* frente a 17,5 *fold change*), ni tampoco en el recuento de eosinófilos (300/ μ l frente a 220/ μ l) o en los valores del FEV₁ (3620 ml frente a 3780 ml).

Tras varias dosis de tratamiento complementario con benralizumab, todos los pacientes experimentaron una notable mejoría de los síntomas sin presencia de reacciones adversas, alcanzando un buen control de su enfermedad asmática grave. Esta mejoría se vio reflejada por los cambios significativos observados en las diferentes variables clínicas evaluadas antes y después del tratamiento, tal y como se detalla a continuación (Tabla 24). Cabe destacar que parte de este seguimiento coincidió con la pandemia por COVID-19, por lo que fue complicado valorar la misma dosis postratamiento en todos los pacientes y no se pudieron obtener algunos parámetros clínicos.

Tabla 24. Recuento de eosinófilos, niveles de expresión de IL5RA y parámetros clínicos de cada paciente en el pretratamiento y postratamiento con benralizumab.

Paciente	Tratamiento	Eosinófilos/ μ l	Expresión de IL5RA	FEV ₁		FeNO (ppb)	Exacerbaciones	GCO	ACT
				(ml)	(%)				
1	Basal	630	1,8 *	1897	62,4	43	2	Si (6 mg/día)	13
	3ª dosis	10	0,6 *	2462	81	68	0	Si (4,5 mg/día)	22
2	Basal	820	29,2	1960	60,7	100	0	Si	8
	3ª dosis	10	1,2	2520	78	-	0	No	24
3	Basal	437	10,9	2310	68	154	3	No	12
	3ª dosis	0	1,0	3100	96,5	113	0	No	22
4	Basal	1290	62,5	1890	65	78	2	No	19
	3ª dosis	0	4,7	2840	105,5	198	0	No	25
5	Basal	630	12,6	2060	79	65	2	No	12
	3ª dosis	10	0,8	2630	99	64	1	No	21
6	Basal	440	5,6	1760	56,7	63	1	No	8
	2ª dosis	0	0,5	2510	80,8	-	1	No	24
7	Basal	1690	33,1	1800	55	68	3	Si	10
	3ª dosis	10	1,3	2860	87	29	0	No	23
8	Basal	880	26,7	1820	63,7	50	2	No	10
	2ª dosis	0	0,7	2330	84	-	0	No	23
9	Basal	700	16,3	2910	75	77	4	No	15
	2ª dosis	10	0,9	3740	100	107	0	No	24
10	Basal	980	42,3	1830	77	40	2	Si	15
	5ª dosis	40	2,0	2610	117	74	0	No	22
11	Basal	640	15,8	1030	40	45	6	Si	11
	5ª dosis	0	1,2	1230	50,4	32	0	No	20

ACT: test de control del asma; GCO: glucocorticoides orales. * Resultados influidos por el tratamiento diario con GCO.

a) Recuento de eosinófilos y niveles de expresión de *IL5RA*

Antes de comenzar el tratamiento con benralizumab, todos los pacientes presentaron un recuento superior a 300 eosinófilos/ μ l, observándose una mediana de 700 eosinófilos/ μ l (RI = 350). Destacan los pacientes 4 y 7, que presentaron un recuento superior a 1000 eosinófilos/ μ l. Después del tratamiento con benralizumab, se observó en todos los pacientes una reducción significativa en el recuento de eosinófilos, entre un 95 % y un 100 % respecto a su valor inicial en el pretratamiento ($P = 0,001$). La mayoría de pacientes presentaron un recuento de 0 y 10 eosinófilos/ μ l, siendo más elevado en el paciente 10, que presentó un recuento de 40 eosinófilos/ μ l (Figura 49-A).

En cuanto a los niveles de expresión de *IL5RA*, antes del tratamiento con benralizumab se observó una mediana de 16,3 *fold change* (RI = 22,2). Destacan los pacientes 4 y 10, que presentaron los niveles de expresión de *IL5RA* más elevados, siendo de 62,5 y 42,3 *fold change*, respectivamente. Por el contrario, los pacientes 1 y 6 presentaron los niveles de expresión de *IL5RA* más bajos, cercanos al rango de normalidad (5,4 *fold change*), siendo de 1,8 y 5,6 *fold change*, respectivamente. En el caso del paciente 1 hay que destacar que los niveles de expresión de *IL5RA* se ven influidos por el tratamiento diario con glucocorticoides orales. Después del tratamiento con benralizumab, se observó en todos los pacientes una reducción significativa de los niveles de expresión de *IL5RA*, entre un 90 % y un 97 % respecto a su valor inicial en el pretratamiento ($P = 0,001$), excepto en el paciente 1 en el que fue de un 67 %. Todos los pacientes presentaron niveles de expresión de *IL5RA* inferiores al punto de corte, observándose una mediana de 1 *fold change*. Únicamente, en el paciente 4, los niveles de expresión fueron ligeramente más elevados, siendo de 4,7 *fold change* (Figura 49-B).

Además, se analizó la relación entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de *IL5RA* en los pacientes estudiados, antes y después del tratamiento con benralizumab (Figura 50). El paciente 1 fue excluido en este análisis debido a la influencia de los glucocorticoides orales en la expresión de *IL5RA*. Se encontró una correlación positiva fuerte en el pretratamiento ($\rho = 0,939$; $P < 0,001$), observándose cierta dispersión en relación con el paciente 7, que presentó

un recuento de eosinófilos más elevado que el observado en otros pacientes con niveles similares de expresión de *IL5RA*.

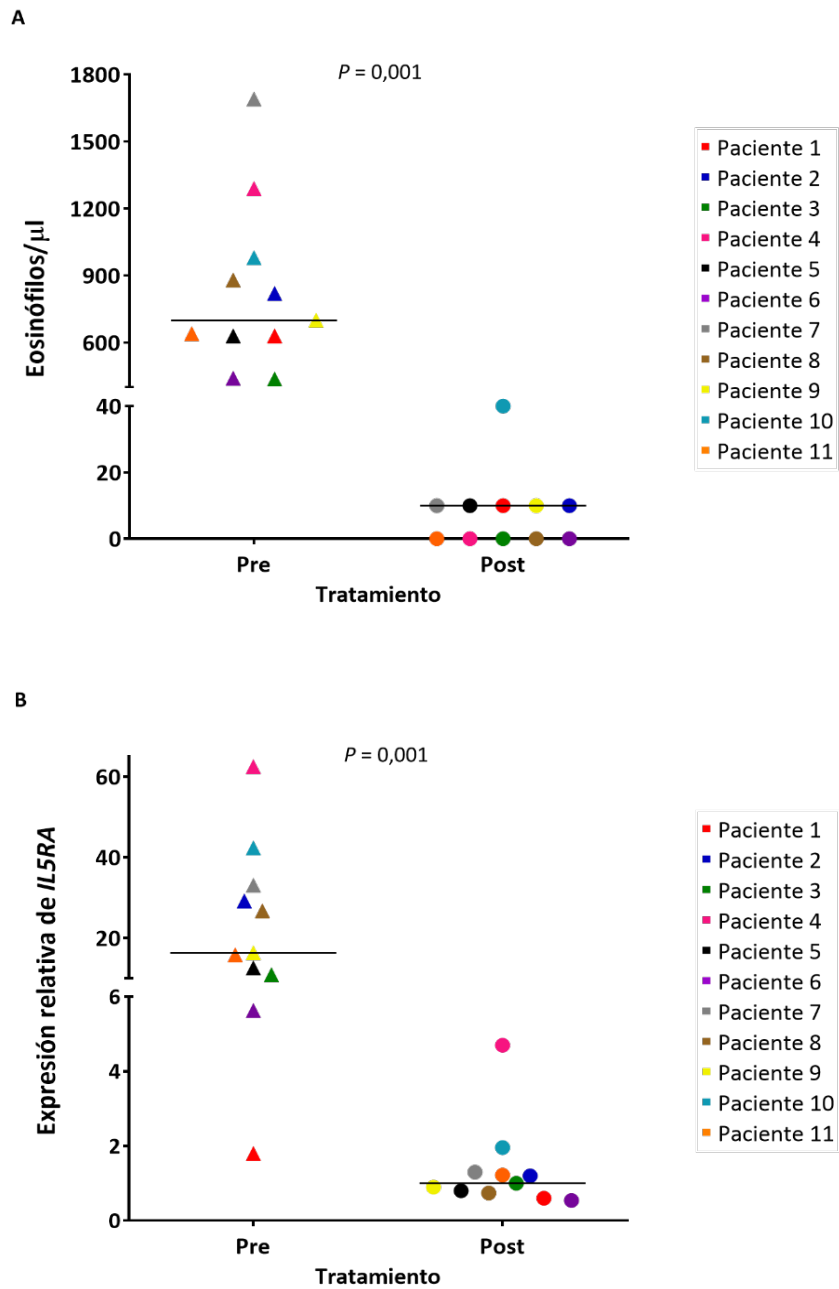


Figura 49. Recuento de eosinófilos (A) y niveles de expresión relativa de *IL5RA* (B) en el pretratamiento (\blacktriangle) y después del tratamiento con benralizumab (\bullet). Se muestra la mediana de cada grupo y el nivel de significación.

Resultados

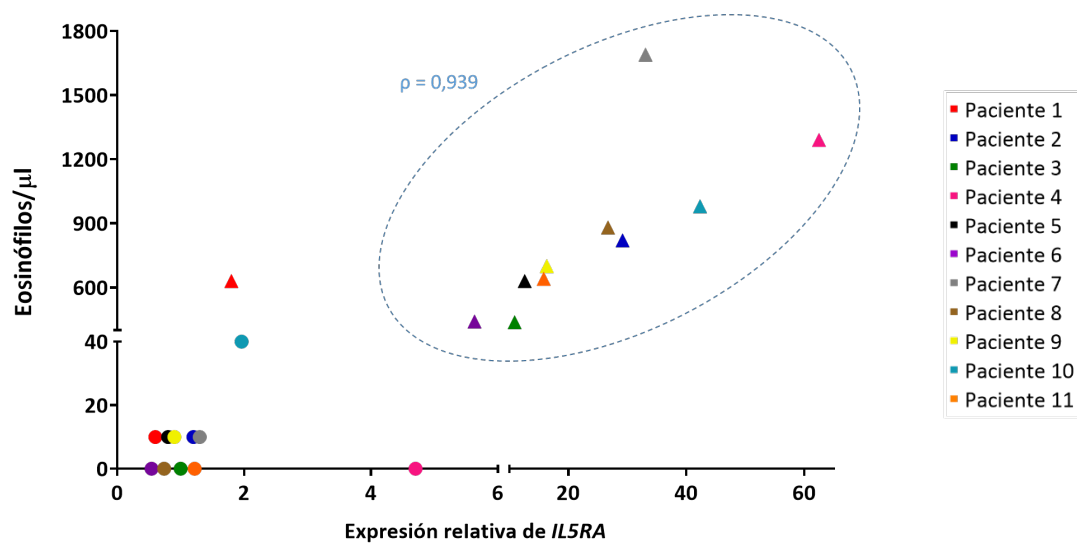


Figura 50. Correlación entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión relativa de IL5RA en el pretratamiento (▲) y después del tratamiento con benralizumab (●). Se muestra el coeficiente de correlación de Spearman en el pretratamiento.

b) Parámetros clínicos

Función pulmonar

Antes de comenzar el tratamiento con benralizumab, todos los pacientes presentaron un $FEV_1 < 80\%$, observándose una mediana del $63,7\%$ (RI = 18,3). Destaca el paciente 11 porque presentaba el FEV_1 más bajo, 40% . Después del tratamiento con benralizumab, se observó en todos los pacientes una mejoría significativa del $FEV_1 \geq 200$ ml y $\geq 12\%$ respecto a su valor inicial en el pretratamiento ($P = 0,001$), observándose una mediana del 87% (RI = 18,2). Todos los pacientes fueron considerados, por tanto, buenos respondedores en términos del FEV_1 . Tal y como se observa en la figura 51, destacan los pacientes 4, 6, 7 y 10 debido a que presentaron un porcentaje de mejoría del FEV_1 superior al 40% , mientras que en el paciente 11 no llegó al 20% .

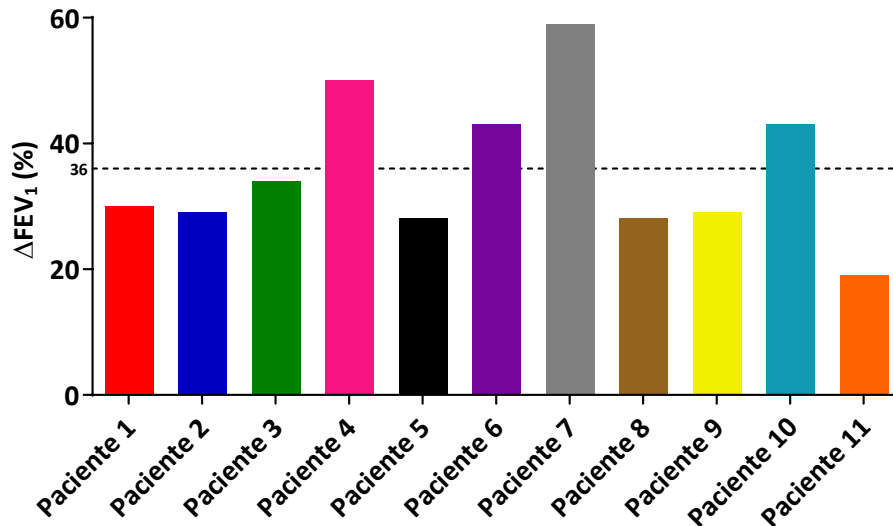


Figura 51. Porcentaje de mejoría del FEV₁ después del tratamiento con benralizumab en cada paciente. Se muestra la media de todos los pacientes con una línea punteada.

Además, se analizó la relación entre el porcentaje de mejoría del FEV₁ después del tratamiento con benralizumab y los niveles basales de expresión de *IL5RA* en los pacientes estudiados (Figura 52). Llama la atención el hecho de que los tres pacientes que mejor respuesta pulmonar presentaron (4, 7 y 10) fueron los que tenían inicialmente unos niveles de expresión de *IL5RA* más elevados.

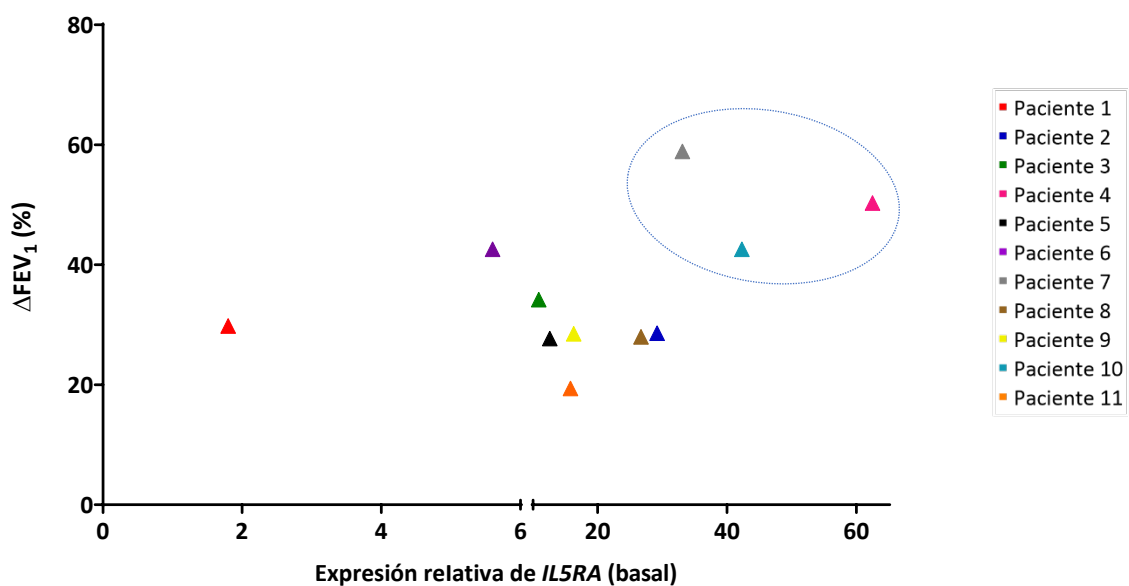


Figura 52. Correlación entre el porcentaje de mejoría del FEV₁ después del tratamiento con benralizumab y los niveles basales de expresión relativa de *IL5RA* en cada paciente.

Por otro lado, todos los pacientes mostraron valores de FeNO elevados (> 25 ppb) tanto en el pretratamiento como después del tratamiento con benralizumab, sin observarse diferencias significativas.

Exacerbaciones

Inicialmente todos los pacientes presentaban al menos una exacerbación asmática, excepto el paciente 2 que no presentaba exacerbaciones. Después del tratamiento con benralizumab se redujo la tasa de exacerbaciones en los pacientes, llegando a desaparecer en la mayoría de ellos. En el paciente 6, por el contrario, no se observaron modificaciones en el número de exacerbaciones.

Además, los cuatro pacientes que inicialmente precisaban tratamiento de rescate con glucocorticoides orales dejaron de necesitarlo tras el tratamiento con benralizumab. Asimismo, el paciente 1 redujo la dosis diaria necesaria de glucocorticoides orales tras el tratamiento con benralizumab.

Test de control del asma

Antes de comenzar el tratamiento, todos los pacientes presentaron un resultado del ACT < 20 puntos, lo cual indicaba que el asma estaba parcialmente o mal controlada. Después del tratamiento con benralizumab se observó en todos los pacientes un resultado del ACT \geq 20 puntos y un incremento clínicamente significativo de más de 3 puntos, por lo que fueron considerados buenos respondedores en el ACT. Destacan los pacientes 2, 6, 7 y 8 debido a que presentaron un incremento de más de 10 puntos, siendo además los pacientes 2 y 6 los que partían de un peor resultado basal.

c) Evaluación de la respuesta al tratamiento

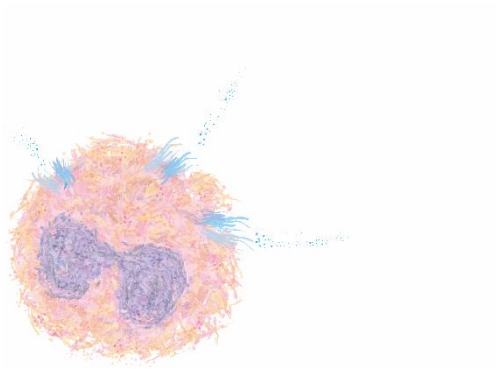
La mayoría de los pacientes fueron considerados superrespondedores al tratamiento con benralizumab en el corto periodo de tiempo evaluado, a excepción de los pacientes 5 y 6, que no cumplieron los criterios especificados en el estudio Delphi debido a no presentar eliminación de las exacerbaciones. Asimismo, el paciente 6 obtuvo la puntuación más baja según el índice FEOS, mientras que los pacientes 3, 4, 7, 8, 9 y 10 obtuvieron la máxima puntuación posible (Tabla 25).

Tabla 25. Puntuación obtenida por cada paciente para evaluar su respuesta a benralizumab según el estudio Delphi (110) y el índice FEOS (111).

Paciente	Criterios estudio Delphi ^a	Índice FEOS ^b	Superrespondedor
1	2 mayores y 2 menores	86 %	Si
2	2 mayores y 2 menores	97 %	Si
3	2 mayores y 2 menores	100 %	Si
4	2 mayores y 2 menores	100 %	Si
5	1 mayor y 2 menores	86 %	No
6	1 mayor y 2 menores	64 %	No
7	3 mayores y 2 menores	100 %	Si
8	2 mayores y 2 menores	100 %	Si
9	2 mayores y 2 menores	100 %	Si
10	3 mayores y 2 menores	100 %	Si
11	3 mayores y 1 menor	98 %	Si

^a Para ser considerado superrespondedor deben cumplirse 3 o más criterios, siendo al menos 2 de ellos criterios mayores; ^b Se muestra la puntuación obtenida respecto al máximo posible para cada paciente.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

El desarrollo de nuevas terapias biológicas ha promovido la evolución de las estrategias utilizadas en el tratamiento del asma. El elevado coste de estas terapias conlleva la necesidad de realizar una adecuada selección de los pacientes más idóneos para beneficiarse de cada tratamiento, proporcionando así un enfoque terapéutico personalizado en función de las características individuales de cada paciente. De esta manera, es posible garantizar una buena tolerabilidad a la terapia y un control eficaz de la enfermedad a largo plazo.

En la práctica diaria, la elección del tratamiento más adecuado se basa en parámetros clínicos y de laboratorio que deben ser indicativos de los diferentes fenotipos o endotipos del asma. En este sentido, los biomarcadores se definen como parámetros fisiológicos que pueden utilizarse, de forma individual o combinados, como indicadores de un determinado proceso patológico, de su gravedad o de la respuesta al tratamiento. Actualmente, los biomarcadores más utilizados en el asma son el recuento de eosinófilos en esputo inducido o en sangre periférica, los niveles séricos de IgE total y los niveles de FeNO. Sin embargo, la mayoría de ellos presentan ciertas limitaciones. Para la identificación de nuevos biomarcadores es imprescindible una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes, lo cual ha impulsado la aplicación de los estudios transcriptómicos como punto de partida para el descubrimiento de nuevos genes implicados en el asma.

En un estudio transcriptómico previo realizado en nuestro grupo, se identificó un aumento en la expresión del receptor de la interleucina 4 (IL-4R) en las células B de pacientes con asma alérgica por ácaros, lo cual se relacionó con la elevación de los niveles séricos de IgE (235). En la presente Tesis Doctoral, nos hemos querido centrar en la relevancia de otra citocina tipo Th2, la IL-5, que también destaca por su importante papel en la fisiopatología del asma. Por ello, hemos realizado un análisis de la expresión de IL-5RA debido a su implicación en la inmunidad mediada por los eosinófilos, así como por la existencia de benralizumab, una terapia biológica utilizada recientemente en el tratamiento del asma que está dirigida específicamente contra esta molécula.

5.1. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO

5.1.1. Características de la población a estudio

Los controles mostraron una edad significativamente mayor que los pacientes, debido a que se requiere un periodo de tiempo más prolongado para confirmar que no desarrollaban la enfermedad. En cuanto a la distribución por sexos, no se observaron diferencias significativas entre el grupo de controles y el grupo de pacientes. Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de IgE entre el grupo de controles y el grupo de pacientes, siendo superior en los pacientes asmáticos, como ya se ha descrito anteriormente (236). También se observaron diferencias significativas con relación al recuento de eosinófilos, siendo mayor en el grupo de pacientes, como era de esperar debido a la fisiopatología del asma.

Con el objetivo de que la población seleccionada fuese homogénea y debido a los estudios previos con ácaros ya realizados en nuestro grupo (235), todos los pacientes de este estudio transcriptómico presentaron monosensibilización a pólenes. Atendiendo a la gravedad, se observó cierto predominio del asma persistente moderada seguida del asma intermitente, mientras que el asma persistente grave fue poco frecuente. Esto se relaciona con los datos recogidos por un estudio europeo en el que se observó que en Italia y España fue más frecuente el asma intermitente, mientras que en Francia lo fue el asma persistente moderada. No obstante, en este país destacó una mayor frecuencia del asma persistente grave respecto al resto de países (237). También se observaron datos similares en otro estudio realizado en la Península Ibérica, en el que predominó el asma intermitente, aunque el asma persistente moderada fue menos frecuente que en nuestro estudio (19).

Se ha sugerido que la historia familiar tiene un papel importante como factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad asmática. En este estudio, el 30 % de los pacientes presentó algún tipo de antecedente de asma o atopia, similar a lo observado en el estudio FENASMA (238).

Por último, aproximadamente la mitad de los pacientes recibía algún tipo de tratamiento, lo cual se relaciona con la gravedad del asma descrita en nuestra población. Esto se debe a que la mayoría de los pacientes con asma intermitente presentaba buen control de la enfermedad, sin necesidad del uso de glucocorticoides inhalados, mientras que los pacientes con asma persistente moderada mostraban generalmente peor control y evolución, precisando diariamente de dicho tratamiento. Así mismo, los pacientes tratados con inmunoterapia específica con alérgenos principalmente presentaban asma bien controlada (2). Es importante destacar el hecho de que ninguno de los pacientes recibía tratamiento con glucocorticoides orales, ya que esto podría influir en la expresión génica debido a su mayor biodisponibilidad sistémica en comparación con los glucocorticoides inhalados, que presentan un efecto principalmente local (239).

5.1.2. Análisis transcriptómico

En este estudio se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de transcritos entre el grupo de controles y el grupo de pacientes con asma alérgica, encontrándose un total de 109 transcritos con expresión diferencial. De ellos, se seleccionaron por su mayor significación estadística y funcional un total de 44 transcritos codificantes, de los cuales 21 estaban sobreexpresados y 23 estaban infraexpresados. No obstante, en nuestro grupo también se han llevado a cabo otros estudios con transcritos no codificantes (240).

Al realizar el análisis de enriquecimiento ontológico, se observó que la mayoría de estos transcritos participaban en procesos biológicos relacionados con el sistema inmunitario, lo que sugiere su posible implicación en la fisiopatología del asma. En la literatura se ha descrito que la galectina-10, codificada por *CLC*, se relaciona con la inflamación eosinofílica en el asma (241,242) y la presencia de EREA (243), y que la lipoxigenasa ALOX15 promueve la infiltración eosinofílica en enfermedades como el asma (244), la EREA (245) o la poliposis nasosinusal (246), observándose niveles elevados de ambas proteínas en los pacientes. Además, varios de estos transcritos codifican receptores de membrana de los eosinófilos, como *IL5RA*, *HRH4* o *PTGDR2*,

siendo propuestos como dianas terapéuticas de enfermedades inflamatorias. En este sentido, se ha observado que el receptor de histamina H4 interviene en la quimiotaxis de los eosinófilos y en la regulación de las moléculas de adhesión (247,248). Asimismo, se han obtenido niveles de expresión elevados de *PTGDR2* en la superficie de eosinófilos de pacientes con dermatitis atópica (249), en el lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos (250) y, recientemente en nuestro grupo, en muestras de sangre de pacientes asmáticos, mostrando correlación con el recuento de eosinófilos (251). En cambio, se ha sugerido la implicación del receptor Flt3 y su ligando en la prevención del desarrollo de inflamación tipo 2 en el asma alérgica, debido a su relación con la proliferación de células dendríticas con funciones reguladoras (252,253). También la lactotransferrina, codificada por *LTF*, destaca por su papel como factor antiinflamatorio e inmunomodulador, produciendo inhibición de la migración de eosinófilos en el asma (254,255).

Por otro lado, diferentes trabajos han señalado la implicación de las metaloproteinasas de la matriz en la patología asmática. En este sentido, se han descrito niveles aumentados de MMP-8 en el lavado broncoalveolar de pacientes con asma grave no controlada sin tratamiento frente a pacientes con buen control (256), así como una elevación significativa de MMP-9 tras la exposición a alérgenos en pacientes con asma alérgica o durante la exacerbación asmática frente a su posterior remisión (257–260). Destaca así su participación en el proceso activo de remodelación de las vías respiratorias (261). Igualmente, se ha observado un aumento de actividad de la arginasa-1 en las vías respiratorias en modelos animales y pacientes asmáticos, provocando una deficiencia de NO, que posee acción broncodilatadora y antiinflamatoria (262,263). En nuestro estudio, por el contrario, los transcritos *MMP-8*, *MMP-9* y *ARG1* se encontraron infraexpresados en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles. No existe una explicación clara para justificar este hallazgo. Estas diferencias podrían relacionarse con la distribución descrita en nuestra población en cuanto a la gravedad del asma y al uso de tratamientos en los pacientes mal controlados o a posibles diferencias en la carga genética poblacional. Cabe destacar que en este tipo de estudios es frecuente la dificultad en la replicación de

resultados en distintas poblaciones, por lo que resulta esencial una estricta caracterización clínica de los grupos de controles y pacientes estudiados.

Asimismo, llama la atención el hecho de que varios de los transcritos sobreexpresados están implicados en funciones relacionadas con la inflamación eosinofílica, como *ALOX15*, *CLC*, *CNR2*, *HRH4*, *IL5RA* y *PTGDR2*, mientras que muchos de los transcritos infraexpresados se relacionan con la desgranulación de neutrófilos, como *ABCA13*, *ARG1*, *CEACAM8*, *CRISP3*, *LTF*, *MMP8* y *MMP9*. Esto sugiere una mayor asociación de los eosinófilos con la inflamación presente en nuestros pacientes con asma alérgica, como ya ha sido descrito en la bibliografía (264,265), aunque el papel de los neutrófilos en algunos tipos de asma aún se está investigando.

Hasta la fecha, se han publicado diversos estudios transcriptómicos con resultados similares a los nuestros. Jiang *et al.* (266) encontraron 59 transcritos con expresión diferencial en pacientes jóvenes con atopia y asma alérgica, entre los que se hallaban sobreexpresados *IL5RA*, *SMPD3*, *ALOX15*, *PIK3R6*, *CLC*, *PTGDR2*, *RAB44* y *HRH4*, y las principales vías biológicas implicadas fueron las vías de activación Th2 y Th1/Th2. Recientemente, también se ha descrito la sobreexpresión de *CLC*, *IL5RA*, *HRH4*, *CYSLTR2* y *PIK3R6* al estudiar la presencia de varias enfermedades alérgicas, como el asma, la dermatitis atópica y la rinitis, en un mismo individuo (267). En este trabajo destacó el papel de los eosinófilos en procesos biológicos como “respuesta inmunitaria” y “transducción de señales”, junto a la vía de transmisión de señales IL-5/JAK/STAT. Por otro lado, Virkud *et al.* (268) identificaron 31 transcritos con expresión diferencial en relación con los niveles séricos de IgE total en pacientes asmáticos, entre los que se hallaban sobreexpresados *CLC*, *PIK3R6*, *LGALS12*, *IL5RA* y *SMPD3*; mientras que en otro estudio se correlacionó la sobreexpresión de *SMPD3*, *IL5RA*, *PIK3R6*, *PTGDR2*, *ALOX15* y *HRH4* con el recuento de eosinófilos en sangre periférica (269). Respecto a los transcritos infraexpresados, destaca *LTF*, cuya expresión diferencial ha sido identificada en muestras de pacientes asmáticos (270,271).

En contraste a lo mencionado hasta ahora, otro estudio describió la sobreexpresión de transcritos relacionados con los neutrófilos en pacientes con asma grave, entre los que se encontraron *CEACAM8*, *LTF*, *MMP8* y *CRISP3*, así como de

transcritos relacionados con los eosinófilos en pacientes con asma moderada, como *ALOX15* e *IL5RA* (272). La discrepancia observada en la sobreexpresión de algunos de los transcritos entre ambos trabajos podría asociarse con el hecho de que la mediana del recuento de neutrófilos en su caso fue más elevada en los pacientes con asma grave, 4700/ μ l, que en los controles y los pacientes con asma persistente moderada, 3000/ μ l y 3100/ μ l respectivamente, siendo esto último más similar a lo descrito en nuestra población, en la que predominó el asma persistente moderada y fue poco frecuente el asma grave. Esto podría justificar el predominio en nuestro estudio de los transcritos sobreexpresados relacionados con los eosinófilos y no con los neutrófilos. Dicha diferencia de expresión génica entre distintos grupos de pacientes asmáticos resalta la importancia del análisis de poblaciones celulares circulantes para estratificar a los pacientes e identificar vías moleculares implicadas y posibles biomarcadores, tal y como proponen Bigler *et al.* (272).

Entre todos los transcritos seleccionados en nuestro estudio, *IL5RA* fue uno de los que mayor expresión diferencial mostró, destacando entre los transcritos sobreexpresados en el grupo de pacientes con asma alérgica respecto al grupo de controles. Este hallazgo está respaldado por su papel en la inflamación de tipo Th2 en la enfermedad asmática (273,274) y por la existencia de otros estudios transcriptómicos relacionados con el asma en los que también ha sido identificado, tal y como se ha mencionado previamente. También destacan sus interacciones con otras moléculas implicadas en la respuesta inmunitaria, observadas en la red de interacciones proteína-proteína de este estudio. Concretamente, *IL5RA* se localizó en un *cluster* junto a *CNR2*, *CXCL5*, *HRH4* y *PTGDR2*. Según la literatura, las proteínas codificadas por estos transcritos participan en funciones relacionadas con la respuesta inflamatoria, la transducción de señales y la inmunidad mediada por eosinófilos, como la quimiotaxis, la regulación de la producción de citocinas tipo Th2 o la diferenciación y proliferación celular (275–278). Estas funciones son consistentes con los procesos biológicos obtenidos en el análisis de enriquecimiento ontológico de nuestro estudio. Además, *IL5RA* se relacionó con vías biológicas como la cascada Ras/MAPK, que juega un papel importante en la respuesta inmune y la transducción de señales mediadas por citocinas (279).

Hay que destacar también el desarrollo en los últimos años de terapias biológicas para el asma que actúan contra IL-5 y su receptor, destacando la existencia de benralizumab, que actúa directamente contra IL-5RA. En este sentido, varios estudios transcriptómicos publicados recientemente han descrito diferencias en la expresión de *IL5RA* entre muestras de pacientes asmáticos pre y post tratamiento. Concretamente, Sriram *et al.* (280) identificaron una reducción significativa en la expresión de varios transcritos relacionados con eosinófilos y basófilos, como *CLC* e *IL5RA*, tras 54 semanas de tratamiento con benralizumab. La infraexpresión de estos transcritos predominó sobre todo en los pacientes con elevado recuento de eosinófilos en sangre periférica. También Nakajima *et al.* (281) identificaron una reducción significativa en la expresión de transcritos relacionados con la respuesta inflamatoria eosinofílica, como *ALOX15* e *IL5RA*, tras cuatro meses de tratamiento con benralizumab. Aquellos pacientes que presentaron mayor expresión de estos transcritos antes del tratamiento mostraron mejor respuesta a benralizumab que los que presentaron mayor expresión de transcritos relacionados con los neutrófilos.

Todo lo descrito anteriormente convierte a *IL5RA* en un posible biomarcador del asma con inflamación eosinofílica, por lo que fue seleccionado en esta Tesis Doctoral como gen candidato para su validación, realizando un análisis más completo en la población asmática. No obstante, este estudio transcriptómico reveló la expresión diferencial de otros genes implicados en el asma, por lo que su posible papel como biomarcadores de esta patología se validará en trabajos posteriores.

5.2. ESTUDIO DE VALIDACIÓN

5.2.1. Características de la población a estudio

Al igual que en el estudio transcriptómico, se encontraron diferencias significativas en la media de edad entre el grupo de controles y el grupo de pacientes. Además, se observaron diferencias en cuanto a la edad de los pacientes y su relación con la atopia. Los pacientes con asma no alérgica mostraron una edad significativamente mayor que los pacientes con asma alérgica. Esto es debido a que, generalmente, la

aparición de la enfermedad en pacientes que no presentan atopia se relaciona con edades más avanzadas, mientras que la presencia de atopia se relaciona con edades de inicio más tempranas (282,283). También los pacientes asmáticos con poliposis nasosinusal mostraron una edad significativamente mayor que los que no la presentaban, ya que esta patología es más frecuente en la edad adulta y de aparición posterior al asma (211,284). En el mismo sentido, la mayoría de los pacientes que presentaban asma de inicio precoz eran alérgicos sin poliposis nasosinusal. En cuanto a la distribución por sexos, se observó una tendencia hacia el sexo femenino, pero no se observaron diferencias significativas entre el grupo de controles y el grupo de pacientes. No obstante, en el caso del asma alérgica con poliposis nasosinusal se observó un desplazamiento hacia el sexo masculino, lo cual se relaciona con el hecho de que, en general, la poliposis nasosinusal es más frecuente en hombres (285). En cambio, también hay estudios que afirman que la aparición de poliposis nasosinusal asociada al asma es más probable en mujeres (286). Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de IgE entre el grupo de controles y el grupo de pacientes. Como era de esperar, también se encontraron diferencias significativas relacionadas con la atopia, observándose niveles séricos de IgE más elevados en los pacientes con asma alérgica (282). En cuanto a los niveles de FeNO, se encontró un incremento significativo relacionado con la presencia de poliposis nasosinusal en los pacientes asmáticos, al igual que en publicaciones previas (287).

En este estudio, la atopia estuvo presente en más de la mitad de los pacientes, correspondiendo la mayor proporción al asma alérgica sin poliposis nasosinusal (41,9 %). Esto se corresponde con el hecho de que el asma alérgica es la más frecuente, con una prevalencia del 60-70 % en pacientes adultos (288). Además, se ha descrito una menor prevalencia de poliposis nasosinusal asociada al asma alérgica en comparación con el asma no alérgica (284,289). Por otra parte, el asma eosinofílica supuso una proporción superior a la del asma no eosinofílica, lo cual coincide con la afirmación de que el 70-80 % de los pacientes asmáticos sin tratamiento y el 50 % de los pacientes tratados con glucocorticoides presenta un recuento elevado de eosinófilos en esputo (290).

Atendiendo a la gravedad, se observó cierto predominio del asma persistente moderada seguida del asma intermitente. Estos resultados fueron similares a los observados en el estudio transcriptómico, aunque la frecuencia del asma persistente grave en el estudio de validación fue mayor (13,7 %). En este sentido, se ha descrito que aproximadamente el 10 % de la población asmática adulta presenta clínica de asma grave (3), lo cual se asemeja a los resultados obtenidos.

Respecto a la sensibilización alérgica, la mayoría de los pacientes presentaron sensibilización a más de un grupo de aeroalérgenos, siendo inferior el número de pacientes monosensibilizados, tal y como se describe en estudios previos (291,292). Asimismo, el grupo de aeroalérgenos más frecuentemente observado fue el de los pólenes (19,293,294), tanto en la población general (79,3 %) como en los pacientes monosensibilizados (57,5 %), coincidiendo con la selección de pacientes realizada en el estudio transcriptómico.

El 47,5 % de los pacientes presentó algún tipo de antecedente de asma o atopia, lo cual se relaciona con la importancia de la historia familiar como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Además, la mayoría de los pacientes con antecedentes de atopia presentaban asma alérgica. También se observó que el 17,7 % de los pacientes presentó algún tipo de hipersensibilidad a los AINE, siendo más frecuente la hipersensibilidad respiratoria, y la presencia de EREA fue del 11,1 %. Según un meta-análisis realizado en 2015 (295), la prevalencia de EREA en la población asmática adulta en general es del 7 % y aumenta al 15 % en el asma grave. Por último, más de la mitad de los pacientes recibía tratamiento con glucocorticoides inhalados, mientras que una menor proporción recibía inmunoterapia específica con alérgenos, lo cual se relaciona con la gravedad del asma descrita en este estudio.

En resumen, las características de la población fueron muy similares a las observadas en el estudio transcriptómico, lo cual refuerza la calidad del estudio de validación.

5.2.2. Estudio de asociación de las variables clínicas con el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA*

En este estudio se ha identificado una asociación estadísticamente significativa entre el aumento de los niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica y el diagnóstico del asma. Como era de esperar, esto no ocurrió en el caso del asma no eosinofílica, debido posiblemente a la existencia en estos pacientes de un patrón inflamatorio no T2 con expresión de otro tipo de citocinas. Además, las diferencias fueron menos destacadas en el caso del asma no alérgica sin poliposis nasosinusal, tal vez debido a la ausencia de ambas comorbilidades en comparación con la presencia de al menos una de ellas, si bien no se observó un efecto sumatorio por la presencia de ambas. En este sentido, entre la mayoría de los grupos de pacientes no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *IL5RA* excepto, de nuevo, en relación con la eosinofilia, lo cual parece indicar que podría ser un marcador del asma con patrón inflamatorio tipo T2 en general, independientemente de la presencia de atopia, poliposis nasosinusal o la edad de inicio del asma. En la reciente publicación de la cohorte MEGA sobre la caracterización del asma en la población española (296), tampoco se observó asociación entre el recuento de eosinófilos y el inicio de la enfermedad, mientras que sí fue descrita una relación entre el recuento de eosinófilos superior a 500/ μ l y la presencia de atopia. Al contrario que con los niveles de expresión de *IL5RA*, en nuestro estudio sí hubo diferencias en el recuento de eosinófilos entre la presencia o ausencia de poliposis nasosinusal en los pacientes, debido a que la infiltración eosinofílica de la mucosa nasal es característica de esta patología (297,298).

Por otro lado, cabe destacar que, a medida que se incrementó la gravedad del asma también se observó una tendencia al aumento en los niveles de expresión de *IL5RA*, siendo aproximadamente el doble en el asma persistente grave respecto al asma intermitente, de manera similar a lo descrito por Rial *et al.* (296) para el recuento de eosinófilos. Si bien es verdad que la frecuencia del asma persistente grave en la población estudiada fue menor que en otros grupos, predominó una gran heterogeneidad tanto en los niveles de expresión de *IL5RA* como en el recuento de eosinófilos, relacionándose probablemente con la existencia de diferentes fenotipos,

siendo necesario ampliar el estudio con un mayor tamaño muestral. En este sentido, los trabajos sobre el asma grave sugieren que hasta dos tercios de los pacientes presentan recuentos elevados de eosinófilos en las vías respiratorias, así como otros marcadores de inflamación tipo T2, mientras que el resto presentan un fenotipo inflamatorio no eosinofílico (299). Concretamente, Wenzel *et al.* (300) encontraron resultados similares a los nuestros al evaluar el recuento de eosinófilos en las diferentes categorías del asma persistente, señalando la existencia de dos subtipos inflamatorios diferentes en el asma persistente grave, basados en la presencia o ausencia de eosinófilos. En el caso del asma persistente leve también se observó una gran heterogeneidad en los niveles de expresión de *IL5RA*, pero no fue así en el recuento de eosinófilos. Esto podría sugerir que en estos grupos de pacientes los niveles de expresión del receptor por cada célula no son iguales, lo cual sería interesante estudiar con más detalle.

En cuanto a la sensibilización alérgica, *IL5RA* parece ser un marcador del asma no específico del grupo de aeroalérgenos, de forma similar a lo comentado previamente. Tampoco se han encontrado diferencias significativas entre pacientes monosensibilizados y polisensibilizados. No obstante, llama la atención el hecho de que los pacientes monosensibilizados a pólenes presentaron unos niveles de expresión de *IL5RA* superiores a los de los sensibilizados al resto de aeroalérgenos, siendo además el único grupo en el que se observaron diferencias significativas respecto a los controles. Este hecho destaca especialmente respecto a los resultados observados en la monosensibilización a ácaros. Posiblemente, esto se pueda relacionar con la diferente periodicidad asociada a cada aeroalérgeno. La sensibilidad a los pólenes, al ser estacionales, podría provocar una activación intermitente de la respuesta inflamatoria, y por tanto de *IL-5RA*, siendo ésta inicialmente más intensa durante estos periodos y coincidiendo con la obtención de la muestra, mientras que los ácaros provocan una estimulación constante, haciendo probablemente que los eosinófilos e *IL-5RA* tengan una respuesta mantenida y menos exacerbada (301). Serían necesarios más estudios con un tamaño muestral mayor de pacientes monosensibilizados para su confirmación. En el caso de la monosensibilización a los epitelios, se observó una elevada dispersión asociada a los niveles de expresión de *IL5RA*, lo que dificulta la valoración en este grupo. No obstante, hay que recordar que la sensibilización a pólenes fue la más frecuente en

la población y el grupo de aeroalérgenos utilizado para seleccionar pacientes en el estudio transcriptómico, lo cual verifica los resultados obtenidos para *IL5RA* en cuanto a expresión diferencial.

Por último, podemos descartar la influencia de tratamientos como los glucocorticoides inhalados o la inmunoterapia con aeroalérgenos en la expresión de *IL5RA*, ya que no observamos diferencias significativas entre los pacientes que recibían estos tratamientos y los que no los recibían.

5.2.3. Estudio de correlación entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA*

Entre la amplia variedad de receptores de membrana de los eosinófilos destaca el receptor de alta afinidad IL-5R, debido a su implicación en la fisiopatología del asma y su importante papel en la función biológica de estas células (49). Los resultados obtenidos en nuestro estudio son coherentes con esta afirmación, mostrando una correlación positiva moderada ($p = 0,638$) entre el recuento de eosinófilos en sangre periférica y los niveles de expresión relativa de *IL5RA*. Como era de esperar, esta correlación se observó principalmente en el grupo de pacientes asmáticos, siendo más débil en el grupo de controles, reflejando tanto la activación de los eosinófilos como la expresión de *IL5RA* en esta patología.

Sin embargo, llama la atención el hecho de que la correlación obtenida sea moderada ya que, quizás, cabría esperar una correlación más elevada. Hay que recordar que el análisis de expresión de *IL5RA* se realizó a partir de muestras de sangre periférica, por lo que también incluye otros tipos celulares como pueden ser los basófilos (302), obteniéndose en este caso una correlación positiva débil. Al agrupar eosinófilos y basófilos, el coeficiente de correlación no mejoró ni se observaron diferencias respecto a los resultados iniciales en los eosinófilos, por lo que la aportación de los basófilos parece no influir en gran medida en dicha correlación, siendo más relevante la implicación de IL-5RA en los eosinófilos. Estos resultados podrían justificarse debido a que el porcentaje en sangre periférica representado por los basófilos es reducido e inferior al de los eosinófilos.

A pesar de que tradicionalmente ha sido considerado un receptor característico de los eosinófilos, en un estudio reciente se ha descrito la expresión de IL-5RA en la superficie de neutrófilos del lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos, principalmente, pero también en sangre periférica, donde se observó un alto grado de variabilidad en la expresión (186). En cambio, nuestros resultados mostraron una correlación negativa débil entre los niveles de expresión relativa de *IL5RA* y el recuento de neutrófilos en sangre periférica. Esta discordancia en los resultados probablemente sea debida a las características de la población a estudio, con un mayor predominio de eosinofilia de forma general, por lo que la aportación de los neutrófilos tampoco parece influir en gran medida en nuestros resultados. No obstante, sería interesante hacer estudios complementarios en más pacientes para una correcta valoración.

Otro factor para tener en cuenta, ya que puede influir en la correlación moderada observada en este trabajo, es la presencia de una elevada dispersión en la población a estudio, destacando la existencia de pacientes con los mismos recuentos de eosinófilos que mostraron niveles de expresión de *IL5RA* muy variables, y viceversa. Esta dispersión fue más significativa ante recuentos elevados de eosinófilos, pero también se encontró en los recuentos bajos e incluso en los controles. La existencia de dos poblaciones en el grupo de controles en función de la expresión de *IL5RA* sugiere la posibilidad de que algunos de los que presentan mayor expresión del receptor puedan ser candidatos para desarrollar en el futuro asma u otra patología relacionada. Sería interesante poder hacer un estudio evolutivo de dichos pacientes para analizar su carácter predictivo a largo plazo. De igual manera, se observaron valores muy variables en todos los subgrupos de pacientes asmáticos estudiados, destacando principalmente las diferencias significativas encontradas en el caso del asma con poliposis nasosinusal, en el que la proporción de pacientes con valores discordantes fue menor que en el asma sin poliposis nasosinusal. Esto se relacionaría principalmente con la elevada eosinofilia encontrada en los pacientes, característica de esta patología, puesto que nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de *IL5RA*. En cambio, Gevaert *et al.* (303) si han demostrado la presencia de un aumento de expresión de IL-5RA en la superficie de eosinófilos en sangre periférica de pacientes con poliposis nasosinusal. Por otra parte, aunque no se observaron diferencias significativas en

función de la gravedad, la presencia de una menor proporción de pacientes con valores discordantes en el asma persistente grave concuerda con el hecho de que la gran mayoría sean buenos respondedores al tratamiento con terapias biológicas anti-IL-5RA como benralizumab. No obstante, sería interesante valorar la posibilidad de que algunos pacientes con otros grados de asma persistente y niveles elevados de expresión de *IL5RA* puedan también ser buenos candidatos para recibir estas terapias, por ejemplo, ante un mal control con tratamientos farmacológicos.

Como ya se ha comentado previamente, estos valores discordantes podrían reflejar la expresión de *IL5RA* por parte de otros tipos de células. Aunque su aportación general en este estudio parece no ser muy significativa, podría ser lo que ocurre en algunos de los pacientes que presentaron niveles de expresión de *IL5RA* elevados en comparación con sus recuentos de eosinófilos. Por otro lado, también podrían estar implicados otros factores desconocidos, como pueden ser factores genéticos o ambientales, que modifiquen o regulen la expresión de IL-5RA en la superficie de los eosinófilos. En este sentido, sería interesante el estudio de posibles polimorfismos en *IL5RA* implicados en el asma al igual que ya se ha identificado su relación en patologías como la dermatitis atópica o la EREA (304,305). Por ello, es importante identificar a los pacientes con niveles discordantes entre el recuento de eosinófilos y la expresión de *IL5RA* con el objetivo de valorar en futuros estudios la posibilidad de una terapia personalizada. Por ejemplo, pacientes con niveles elevados de expresión de *IL5RA* y un menor grado de eosinofilia quizás podrían beneficiarse también de terapias biológicas anti-IL-5RA o, por el contrario, pacientes con asma eosinofílica y una menor expresión de *IL5RA* podrían necesitar una adaptación personalizada del tratamiento para alcanzar una respuesta óptima.

Cabe destacar que existen estudios previos en pacientes con eosinofilia en los que también se ha confirmado la existencia de una correlación positiva ($\rho = 0,52$) entre el recuento de eosinófilos y los niveles séricos de la forma soluble de IL-5RA, asociados a su vez a un incremento de los niveles séricos de IL-5; así como una correlación negativa ($\rho = -0,48$) entre el recuento de eosinófilos y la expresión del receptor en la superficie de éstos (306). Resultados similares han sido descritos también por otros autores, sugiriendo que la expresión de IL-5RA en la superficie celular está regulada a la baja por

su propio ligando IL-5 (197,307). Asimismo, se ha sugerido que la expresión de las isoformas de IL-5RA se modifica según el estado de activación, maduración y localización de los eosinófilos (303) y que la forma soluble podría tener un papel protector en el asma (308). Debido a que en nuestro estudio se analizó la expresión de *IL5RA* en general, sin diferenciar entre la forma soluble y la forma anclada a la membrana, los resultados obtenidos podrían incluir ambas formas en conjunto y no reflejar correctamente la expresión del receptor en la superficie celular, lo cual es importante para los estudios farmacogenéticos. Por ello, a la vista de los resultados obtenidos por otros autores, consideramos conveniente ampliar en futuros estudios la cuantificación de IL-5RA mediante citometría de flujo para validar los resultados del análisis de expresión. De igual manera, sería recomendable cuantificar los niveles séricos de IL-5 sobre nuestra población de forma simultánea a los del receptor para valorar el posible efecto en la regulación de su expresión.

5.2.4. *IL5RA* y su aplicación clínica en el asma

Para confirmar el diagnóstico del asma se utilizan frecuentemente las pruebas de función pulmonar, pero éstas no son capaces de reflejar los diferentes mecanismos patológicos subyacentes, los cuales son responsables de distintos fenotipos asmáticos y pueden implicar diferencias en cuanto al tratamiento. Por ese motivo, para determinar el nivel de inflamación en las vías respiratorias, se utiliza la biopsia de tejido y el recuento de células inflamatorias en esputo inducido, aunque ambas técnicas son invasivas, caras y difíciles de aplicar para un uso rutinario (309). En este sentido, existen biomarcadores específicos que van a ayudar a los clínicos a estratificar a los pacientes en función de los diferentes fenotipos, además de servir como apoyo en la selección del tratamiento más eficaz para el paciente. Así, un biomarcador ideal debería poder ser detectado preferiblemente en muestras biológicas no invasivas y ser evaluado mediante métodos rápidos, sencillos y reproducibles, mostrando elevada sensibilidad y especificidad junto a valores predictivos positivos y negativos adecuados (160,310).

Según la interpretación del análisis de las curvas ROC en nuestro estudio, la detección de los niveles de expresión de *IL5RA* podría resultar útil como biomarcador en

el asma, utilizándose siempre en conjunto con la historia clínica del paciente y el resto de los parámetros empleados en el diagnóstico de la enfermedad. No obstante, los valores observados sugieren que el recuento de eosinófilos presenta una mayor capacidad discriminativa que los niveles de expresión de *IL5RA* debido, principalmente, a su mayor especificidad, ofreciendo por tanto una mayor seguridad para afirmar la existencia de una condición patológica ante resultados elevados. En cambio, la moderada sensibilidad y escaso valor predictivo negativo que muestran ambas variables se relacionan con la posibilidad de que éstas no se encuentren elevadas en todos los pacientes asmáticos, lo cual es coherente con la presencia de diferentes recuentos celulares en función de los fenotipos inflamatorios del asma.

En ocasiones, la combinación de diferentes biomarcadores puede llegar a ser más precisa en la caracterización de pacientes que emplear uno individualmente, ya que no siempre existe una asociación evidente entre un único biomarcador y un fenotipo (309). En este sentido, quisimos valorar la posibilidad de que el uso combinado de ambas variables incrementase la capacidad discriminativa que mostraban por separado. No obstante, los resultados obtenidos no indicaron la presencia de valor clínico añadido por parte de los niveles de expresión de *IL5RA* al ya observado de manera individual para el recuento de eosinófilos, ya que no hubo modificación en el valor de AUC de ambas variables en conjunto. Asimismo, se observó un aumento de la sensibilidad al combinar las variables, pero la especificidad, en cambio, resultó menor que la alcanzada individualmente con el recuento de eosinófilos. Como era de esperar, esto sugiere de nuevo que la aportación ofrecida por el recuento de eosinófilos para la clasificación de pacientes asmáticos en función del perfil inflamatorio es mayor que la ofrecida por los niveles de expresión de *IL5RA*. Si bien no descarta la idea de que *IL5RA* pueda tener utilidad como biomarcador en el ámbito de la medicina de precisión para la identificación de aquellos pacientes que presentan diferente respuesta al tratamiento dentro de un determinado fenotipo asmático y que podrían beneficiarse, por tanto, de una terapia personalizada. Esto es particularmente notorio en los pacientes de los cuadrantes 2 y 3, en los que la discordancia entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA* es mayor, y puede contribuir a una mejor selección de los pacientes en un futuro.

5.3. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO

5.3.1. Características de la población a estudio

En este estudio es necesario justificar que, debido a la situación de pandemia por COVID-19 vivida durante el último periodo de realización de la presente Tesis Doctoral, resultó complicado alcanzar un mayor número de pacientes asmáticos en tratamiento con benralizumab que reuniesen las características necesarias en cuanto al seguimiento ininterrumpido de las dosis, así como recoger por completo los parámetros clínicos evaluados en cada paciente debido, principalmente, a la imposibilidad de realizar espirometrías. Por ello, finalmente nos planteamos este estudio farmacogenético como un ensayo preliminar de eficacia (*proof-of-concept*).

Los pacientes seleccionados en este estudio presentaban asma eosinofílica grave no controlada y habían comenzado tratamiento complementario con benralizumab. Las características de la población son coherentes con las observadas en el estudio de validación para el tipo de pacientes seleccionados, siendo la distribución por sexos similar y la media de edad correspondiente a la de los pacientes asmáticos de inicio tardío. Las proporciones observadas para la presencia de atopia y poliposis nasosinusal fueron semejantes debido a que intentamos obtener representación de todos los tipos de pacientes. En cuanto a la sensibilización alérgica, el grupo de aeroalérgenos más frecuentemente observado fue el de los pólenes, tal y como sucedía anteriormente.

Los fármacos que recibían previamente los pacientes a estudio se ajustan a lo recomendado según las directrices de las actuales guías clínicas para el tratamiento del asma grave no controlada, escalones 5-6 según la GEMA (2) o escalón 5 según la GINA (3), incluyendo dosis elevadas de glucocorticoides inhalados más otros fármacos controladores, necesidad del uso eventual de glucocorticoides orales en el caso de exacerbaciones y terapias biológicas. Algunos de los pacientes del estudio ya habían recibido anteriormente terapias anti-IgE y anti-IL-5, que no consiguieron el control de su enfermedad o no fueron bien toleradas por los pacientes, por lo que se decidió cambiar a un biológico anti-IL-5R.

5.3.2. Tratamiento con benralizumab

Inicialmente, antes de comenzar el tratamiento con benralizumab, todos los pacientes estudiados presentaban elevación del recuento de eosinófilos en sangre periférica y de los niveles de expresión de *IL5RA*, así como una función pulmonar alterada, presencia de exacerbaciones y un mal control de los síntomas a pesar del tratamiento con glucocorticoides. Es necesario aclarar que, según las características requeridas en los pacientes para ser incluidos en este trabajo, el paciente 1 recibía tratamiento diario con glucocorticoides orales que no fue posible retirar previamente a la de extracción de la muestra, lo cual influye en el análisis de expresión de *IL5RA*, obteniéndose unos niveles de expresión reducidos que no pueden ser valorados en el seguimiento.

Tras varias dosis de tratamiento con benralizumab se observa, en primer lugar, uno de los resultados más característicos, la reducción en el recuento de eosinófilos en sangre periférica que mostraron todos los pacientes, pasando de una mediana de aproximadamente 700 eosinófilos/ μ l a una cifra cercana a 0 eosinófilos/ μ l, tal y como se ha indicado en los estudios de fase III (311). Esta acción farmacológica es rápida y eficaz, observándose ya en los primeros meses de tratamiento, debido a que no solo bloquea la unión de la IL-5 a la IL-5RA, y con ello la activación y proliferación celular, sino que también provoca la apoptosis de los eosinófilos a través de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (124,125). Cabe decir que el recuento de eosinófilos no resulta útil para evaluar la respuesta a benralizumab, precisamente porque se reduce en todos los pacientes que reciben el fármaco, con independencia de si son respondedores o no respondedores. Por eso quisimos plantear este estudio. En este sentido, los niveles de expresión de *IL5RA* también mostraron una reducción significativa en todos los pacientes tras el tratamiento con benralizumab, pasando de niveles basales elevados, en un rango variable, a cifras dentro del rango de normalidad según nuestro estudio de validación. La reducción en la expresión de *IL5RA* ya ha sido descrita en un estudio transcriptómico tras cuatro meses de tratamiento con benralizumab (281), como ya ha sido comentado previamente. Además, los niveles de expresión de *IL5RA* estaban correlacionados en el pretratamiento con el recuento de

eosinófilos en sangre periférica, presentando cierta desviación en algún paciente, por lo que consideramos que podrían ofrecer un valor clínico añadido.

De la misma manera, tras varias dosis de tratamiento con benralizumab todos los pacientes mostraron una mejoría significativa y muy destacada de la función pulmonar, reflejada en el aumento del FEV₁ respecto a su valor inicial, así como una disminución de la tasa de exacerbaciones, llegando a desaparecer en la mayoría de los pacientes, y una clara mejoría de los síntomas y del control de la enfermedad. Además, los pacientes que inicialmente precisaban del uso de glucocorticoides orales consiguieron eliminarlos o reducir su dosis tras el tratamiento, lo cual se ve favorecido por la disminución simultánea de la tasa de exacerbaciones que, posiblemente, se relaciona a su vez con la mejoría de la función pulmonar (312). Por otro lado, se ha descrito que los tratamientos anti-IL-5 y anti-IL-5R no modifican significativamente los niveles de FeNO (313), al igual que lo observado en este estudio. Recientemente, otros autores han identificado una reducción significativa de los niveles de FeNO a los seis meses de tratamiento con benralizumab, pero sin llegar a alcanzar valores inferiores a 25 ppb (314). El aumento de los niveles de FeNO observado en algunos de nuestros pacientes podría deberse a la exposición aguda a aeroalérgenos (315), ya que el cumplimiento de los glucocorticoides inhalados parecía adecuado. Esto sugiere que el FeNO no es un buen biomarcador para evaluar la eficacia global de estas terapias biológicas, aunque puede ofrecer información adicional sobre el estado de inflamación.

En cuanto a la evaluación de la respuesta de los pacientes al tratamiento con benralizumab, la mayoría de ellos resultaron ser superrespondedores según los criterios establecidos mediante el estudio Delphi (110). No obstante, hay que tener en cuenta que el periodo de tiempo evaluado en este trabajo fue inferior a doce meses, que es lo establecido por consenso, por lo que nuestros resultados son preliminares y deberían ser confirmados ampliando el seguimiento de los pacientes. Asimismo, la puntuación obtenida mediante el índice FEOS fue elevada para la mayoría de los pacientes, llegando incluso alguno de ellos a alcanzar la máxima puntuación posible. Destaca el hecho de que la menor puntuación obtenida correspondiese con el paciente 6, que fue uno de los dos pacientes no superrespondedores. Esto se relaciona, principalmente, con la persistencia de exacerbaciones en este paciente tras el tratamiento con benralizumab

tres meses después, siendo necesario de nuevo ampliar el seguimiento para valorar correctamente la tasa de exacerbaciones. El hecho de que casi todos los pacientes fueran superrespondedores al tratamiento, probablemente debido a una adecuada selección, impide evaluar correctamente el valor de determinación de los niveles de expresión de *IL5RA*, al no poder comparar con pacientes no respondedores. Otro aspecto que hay que tener en cuenta es que la puntuación obtenida mediante el índice FEOS refleja únicamente el grado de mejoría de un paciente determinado respecto al pretratamiento, pudiendo existir diferencias al comparar pacientes con diferentes estados clínicos basales si no se relativiza a la máxima mejoría posible en cada caso (111).

Según la última actualización de la GINA (3), se consideran predictores de buena respuesta a terapias anti-IL-5R las siguientes variables ordenadas de mayor a menor relevancia: eosinofilia en sangre periférica, elevado número de exacerbaciones graves en el último año, asma de inicio tardío, presencia de poliposis nasosinusal, uso de glucocorticoides orales de mantenimiento en condiciones basales y función pulmonar reducida con $FEV_1 < 65\%$. Estas condiciones se vieron representadas en la mayoría de los pacientes de nuestro estudio. En relación a la eosinofilia, destaca el hecho de que los pacientes 4, 7 y 10 presentaron el mayor recuento de eosinófilos en condiciones basales, así como los niveles de expresión de *IL5RA* más elevados, y fueron los que mostraron el mayor incremento del FEV_1 tras el tratamiento con benralizumab, siendo todos ellos superrespondedores. Por el contrario, los pacientes 3 y 6 presentaron el menor recuento de eosinófilos en condiciones basales, similar en ambos casos, y solamente el paciente 6 resultó ser no superrespondedor, siendo el que inicialmente presentaba los niveles de expresión de *IL5RA* más bajos, cercanos a la normalidad y aproximadamente la mitad que los del paciente 3. Sería necesario confirmar este hallazgo en un futuro estudio más completo para evaluar la posible aportación de información adicional de los valores discordantes entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA*. En el caso de la presencia de poliposis nasosinusal, no se observaron diferencias significativas en nuestro estudio, siendo superrespondedores los pacientes de ambos grupos. No obstante, habría que ampliar el estudio con un tamaño muestral más elevado, ya que sí parece que podría haber una tendencia según los resultados descritos

a lo largo de este trabajo. En relación a esto, tampoco se observaron diferencias en función de la atopía, lo cual indica que los efectos terapéuticos de benralizumab son eficaces tanto en pacientes alérgicos como en pacientes no alérgicos con asma eosinofílica grave, como ya ha sido descrito en la bibliografía (314,316).

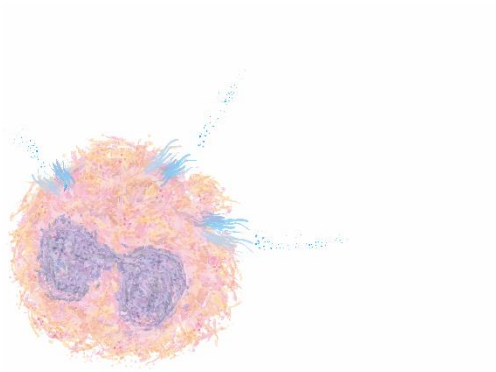
No obstante, este estudio preliminar no está exento de limitaciones, por lo que los resultados obtenidos tendrán que ser debidamente comprobados. En primer lugar, es un estudio unicéntrico con un número de pacientes muy reducido y un corto período de seguimiento, que debería ser ampliado al menos a seis meses o a un año para poder evaluar el tratamiento a largo plazo y en todos los pacientes por igual. Además de aumentar el tamaño poblacional, sería necesario incluir un grupo control para una correcta validación de los resultados obtenidos, aunque esto es difícil al tratarse de un tratamiento tan específico, por lo que la ausencia de control con placebo es una limitación común en este tipo de estudios. En nuestro caso, tampoco encontramos pacientes que respondieran mal o no toleraran la terapia con benralizumab, debido posiblemente a la exhaustiva selección de pacientes realizada por los clínicos para recibir dicho tratamiento. Por otro lado, en este trabajo nos hemos centrado exclusivamente en *IL5RA*, pero también puede ser relevante la implicación de otros genes en la respuesta a esta terapia biológica. No obstante, seleccionamos *IL5RA* por su implicación en la fisiopatología del asma T2 y porque benralizumab está dirigido específicamente contra esta molécula.

Finalmente, cabe hacer una reflexión en lo que concierne a la posible aportación de la determinación de los niveles de expresión de *IL5RA*. Como se aprecia en la figura 41, una parte notable de la población a estudio presenta una correlación entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA*. Sin embargo, existe una población muy interesante, tanto de controles como de pacientes, que presenta un recuento normal de eosinófilos, pero unos niveles elevados de expresión de *IL5RA* (cuadrante 2). En esta población cabe cuestionarse si, a pesar de presentar un recuento normal de eosinófilos, los pacientes podrían ser susceptibles de mejorar con benralizumab. Esto podría beneficiar a algunos pacientes con asma grave, en concreto a aquellos con un recuento bajo de eosinófilos, que no reciben este tratamiento, siendo un caso claro de medicina de precisión. Lo mismo podría suceder, pero a la inversa, con

Discusión

los pacientes que presentan un recuento elevado de eosinófilos y niveles bajos de expresión de *IL5RA* (cuadrante 3), que son mucho menos numerosos. ¿Serían estos pacientes no respondedores a benralizumab? En nuestro caso, parece que los pacientes estudiados pertenecían al cuadrante 4, por lo que no hemos podido responder a esta pregunta. Sin embargo, con el incremento del número de pacientes, podría ser posible conseguir encontrar estos dos tipos de poblaciones de pacientes y confirmar si la determinación de los niveles de expresión de *IL5RA* podría ser un biomarcador predictor de la respuesta a benralizumab.

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

PRIMERA. Existen diferencias en la expresión génica en sangre periférica en los pacientes con asma alérgica, encontrándose diversos transcritos codificantes que podrían tener una implicación clínica en esta patología. Entre ellos destaca *IL5RA* como uno de los transcritos con mayor expresión diferencial.

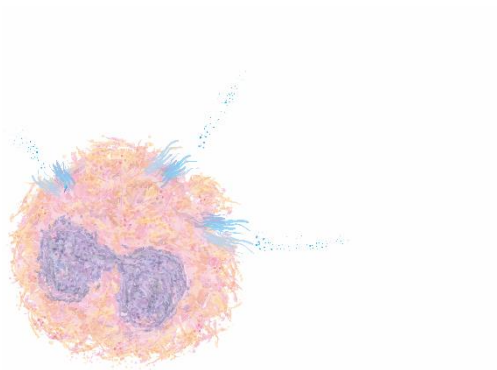
SEGUNDA. Los niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica se encuentran significativamente elevados en los pacientes asmáticos respecto a los controles, por lo que puede constituir un biomarcador de la enfermedad, con el hecho añadido de que reúne otras características exigidas a un biomarcador.

TERCERA. Los niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica no parecen discriminar entre los distintos grupos de pacientes asmáticos, con excepción del asma eosinofílica y no eosinofílica. Para evaluar su utilidad como biomarcador de gravedad de la enfermedad serían necesarios estudios adicionales.

CUARTA. Aunque existe una correlación moderada entre el recuento de eosinófilos y los niveles de expresión de *IL5RA* en sangre periférica en los pacientes asmáticos, se observan valores discordantes en determinados pacientes, sobre todo en aquellos que presentan un recuento de eosinófilos normal y niveles elevados de expresión de *IL5RA*. Este grupo podría ser un objetivo particular en el ámbito de la medicina de precisión, por lo que sería interesante su análisis en estudios futuros.

QUINTA. En los pacientes con asma eosinofílica grave tratados con benralizumab se produjo una reducción significativa de los niveles de expresión de *IL5RA*, observándose una posible relación entre los niveles de expresión basales y la respuesta al tratamiento. Será necesario confirmar estos resultados en un estudio poblacional más amplio y tras un periodo de seguimiento mayor.

BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bergmann KC. Asthma. En: Bergmann KC, Ring J, editors. *History of Allergy. Chemical Immunology and Allergy*; 2014. p. 69–80.
2. Guía española para el manejo del asma (GEMA 5.1). Accedido 8 de abril de 2022, a partir de www.gemasma.com
3. Global Initiative for Asthma. *Global strategy for asthma management and prevention (GINA 2021)*. Accedido 8 de abril de 2022, a partir de www.ginasthma.org
4. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). *GBD 2019 Cause and Risk Summary: Asthma*. Accedido 21 de marzo de 2022, a partir de www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019
5. To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, et al. Global asthma prevalence in adults: Findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*. 2012;12(1):204.
6. Anto JM, Martínez-Moratalla J, Almar E, Aguilar X, Arévalo M, Mateos A, et al. European Study on Asthma. the prevalence of bronchial hyperreactivity and asthma in young adults in 5 Spanish regions. *Medicina Clinica*. 1996;106(20):761–7.
7. Carvajal-Urueña I, García-Marcos L, Busquets-Monge R, Morales Suárez-Varela M, García de Andoin N, Batlles-Garrido J, et al. Variaciones geográficas en la prevalencia de síntomas de asma en los niños y adolescentes españoles. *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) fase III España. Archivos de Bronconeumología*. 2005;41(12):659–66.
8. Lundbäck B, Backman H, Lötvall J, Rönmark E. Is asthma prevalence still increasing? *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2016;10(1):39–51.
9. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: Executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;59(5):469–78.
10. Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures JP. The public health implications of asthma. *Bull World Health Organ*. 2005;83(7):548-54.
11. Martínez-Moragón E, Serra-Batlles J, De Diego A, Palop M, Casan P, Rubio-Terrés C, et al. Coste económico del paciente asmático en España (estudio AsmaCost). *Archivos de Bronconeumología*. 2009;45(10):481–6.
12. Doz M, Chouaid C, Com-Ruelle L, Calvo E, Brosa M, Robert J, et al. The association between asthma control, health care costs, and quality of life in France and Spain. *BMC Pulmonary Medicine*. 2013;13(1):15.
13. INE - Instituto Nacional de Estadística. Accedido 21 de marzo de 2022, a partir de www.ine.es/index.htm
14. Noutsios GT, Floros J. Childhood asthma: Causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Medical Weekly*. 2014;144:w14036.
15. Beuther DA, Weiss ST, Sutherland ER. Obesity and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;174(2):112–9.
16. Arbes SJ, Gergen PJ, Vaughn B, Zeldin DC. Asthma cases attributable to atopy: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;120(5):1139–45.
17. Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;113(5):832–6.
18. Hill DA, Spergel JM. The Atopic March: Critical Evidence and Clinical Relevance. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2018;120(2):131–7.

Bibliografía

19. Valero A, Pereira C, Loureiro C, Martínez-Cócerca C, Murio C, Rico P, et al. Interrelationship Between Skin Sensitization, Rhinitis, and Asthma in Patients With Allergic Rhinitis: A Study of Spain and Portugal. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(3):167–72.
20. Navarro A, Valero A, Juliá B, Quirce S. Coexistence of Asthma and Allergic Rhinitis in Adult Patients Attending Allergy Clinics: ONEAIR Study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008;18(4):233–8.
21. Shaaban R, Zureik M, Soussan D, Neukirch C, Heinrich J, Sunyer J, et al. Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study. *The Lancet*. 2008;372(9643):1049–57.
22. Bro JL, Bousquet J, Agache I, Agarwal A, Bachert C, Bosnic-Anticevich S, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;140(4):950–8.
23. Lin DC, Chandra RK, Tan BK, Zirkle W, Conley DB, Grammer LC, et al. Association between severity of asthma and degree of chronic rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology and Allergy*. 2011;25(4):205–8.
24. Jarvis D, Newson R, Lotvall J, Hastan D, Tomassen P, Keil T, et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: The GA2LEN survey in Europe. *Allergy*. 2012;67(1):91–8.
25. Staikūniene J, Vaitkus S, Japertiene L, Ryskiene S. Association of chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma: clinical and radiological features, allergy and inflammation markers. *Medicina (Kaunas)*. 2008;44(4):257–65.
26. Warner JO. The early life origins of asthma and related allergic disorders. *Archives of Disease in Childhood*. 2004;89(2):97–102.
27. Cauvreau GM, Watson RM, O’Byrne PM. Kinetics of allergen-induced airway eosinophilic cytokine production and airway inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;160(2):640–7.
28. Platts-Mills T, Leung DYM. The Role of Allergens in Asthma. *American Family Physician*. 2007;76(5):675–80.
29. D’Amato G, Cecchi L, D’Amato M, Liccardi G. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(2):95–102.
30. Jenerowicz D, Silny W, Dańczak-Pazdrowska A, Polańska A, Osmola-Mańkowska A, Olek-Hrab K. Environmental factors and allergic diseases. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19(3):475–81.
31. Polosa R, Thomson NC. Smoking and asthma: Dangerous liaisons. *European Respiratory Journal*. 2013;41(3):716–25.
32. Broekema M, Ten Hacken NHT, Volbeda F, Lodewijk ME, Hylkema MN, Postma DS, et al. Airway epithelial changes in smokers but not in ex-smokers with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009;180(12):1170–8.
33. Saglani S. Viral infections and the development of asthma in children. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 2013;1(4):139–50.
34. Liu AH, Szeffler SJ. Advances in childhood asthma: Hygiene hypothesis, natural history, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003;111(Suppl 3):S785–92.
35. Levine SJ, Wenzel SE. Narrative review: The role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes. *Annals of Internal Medicine*. 2010;152(4):232–7.
36. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological Reviews*. 2011;242(1):31–50.
37. Barnes PJ. Pathophysiology of Allergic Inflammation. En: Adkinson NF, Bochner BS, Burks AW, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, et al., editors. *Middleton’s Allergy: Principles and Practice*. 8th Ed. Elsevier Health Sciences; 2013. p. 327–42.
38. Barrett NA, Austen KF. Innate Cells and T Helper 2 Cell Immunity in Airway Inflammation. *Immunity*. 2009;31(3):425–37.

39. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: More than just TH2 cells. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(12):838–48.
40. Newcomb DC, Peebles RS. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(6):755–60.
41. Lambrecht BN, Hammad H. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *The Lancet*. 2010;376(9743):835–43.
42. Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006;117(6):1277–84.
43. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood*. 2000;96(13):4028–38.
44. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic Inflammation in Asthma. *New England Journal of Medicine*. 1990;323(15):1033–9.
45. Price DB, Rigazio A, Campbell JD, Bleecker ER, Corrigan CJ, Thomas M, et al. Blood eosinophil count and prospective annual asthma disease burden: A UK cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2015;3(11):849–58.
46. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;119(6):1303–10.
47. Possa SS, Leick EA, Prado CM, Martins MA, Tibério IF. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. *Frontiers in Pharmacology*. 2013;4:46.
48. McBrien CN, Menzies-Gow A. The biology of eosinophils and their role in asthma. *Frontiers in Medicine*. 2017;4:93.
49. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: Changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(1):9–22.
50. Baines KJ, Simpson JL, Gibson PG. Biology of Neutrophils. In: Adkinson NF, Bochner BS, Burks AW, Busse WW, Holgate ST, Lemanske RF, et al., editors. *Middleton's Allergy: Principles and Practice*. 8th Ed. Elsevier Health Sciences; 2013. p. 280–91.
51. MacDowell AL, Peters SP. Neutrophils in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007;7(6):464–8.
52. Ciepiela O, Ostafin M, Demkow U. Neutrophils in asthma-A review. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2015;209:13–6.
53. Monteseirín J. Neutrophils and Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(5):340–54.
54. Sadik S, Lu Y, Zhu S, Cai J, Mi LL. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s): The spotlight in asthma pathogenesis and lung tissue injury. *Allergol Immunopathol*. 2021;49(2):208–16.
55. Gandhi VD, Vliagoftis H. Airway epithelium interactions with aeroallergens: Role of secreted cytokines and chemokines in innate immunity. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:147.
56. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF, Gibson PG, George SC, Grasemann H, et al. Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases a comprehensive review. *Chest*. 2010;138(3):682–92.
57. Grainge CL, Lau LCK, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, et al. Effect of Bronchoconstriction on Airway Remodeling in Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(21):2006–15.
58. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(3):451–62.
59. Boulet LP. Physiopathology of airway hyperresponsiveness. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2003;3(2):166–71.
60. O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest*. 2003;123(Suppl 3):411S-416S.
61. Guerra S, Sherrill DL, Kurzius-Spencer M, Venker C, Halonen M, Quan SF, et al. The course of persistent airflow limitation in subjects with and without asthma. *Respiratory Medicine*. 2008;102(10):1473–82.

Bibliografía

62. Burke W, Fesinmeyer M, Reed K, Hampson L, Carlsten C. Family history as a predictor of asthma risk. *American Journal of Preventive Medicine*. 2003;24(2):160–9.
63. British Thoracic Society y Scottish Intercollegiate Guidelines Network. British guideline on the management of asthma. A national clinical guideline. Revised 2019. Accedido 5 de abril de 2022, a partir de www.brit-thoracic.org.uk/quality-improvement/guidelines/asthma
64. Bel EH. Clinical phenotypes of asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2004;10(1):44–50.
65. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *European Respiratory Journal*. 2005;26(5):948–68.
66. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: The global lung function 2012 equations. *European Respiratory Journal*. 2012;40(6):1324–43.
67. Kitch BT, Paltiel AD, Kuntz KM, Dockery DW, Schouten JP, Weiss ST, et al. A single measure of FEV1 is associated with risk of asthma attacks in long-term follow-up. *Chest*. 2004;126(6):1875–82.
68. Reddel HK, Salome CM, Peat JK, Woolcock AJ. Which index of peak expiratory flow is most useful in the management of stable asthma? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1995;151(5):1320–5.
69. Crapo RO, Casaburi R, Coates AL, Enright PL, Hankinson JL, Irvin CG, et al. Guidelines for Methacholine and Exercise Challenge Testing - 1999. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000 Jan;161(1):309–29.
70. Perpiñá Tordera M, García Río F, Álvarez Gutierrez FJ, Cisneros Serrano C, Compte Torrero L, Entrenas Costa LM, et al. Guidelines for the Study of Nonspecific Bronchial Hyperresponsiveness in Asthma. *Archivos de Bronconeumología*. 2013;49(10):432–46.
71. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005;171(8):912–30.
72. Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, de Jongste JC. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. *Thorax*. 2006;61(9):817–27.
73. Heinzerling L, Frew AJ, Bindslev-Jensen C, Bonini S, Bousquet J, Bresciani M, et al. Standard skin prick testing and sensitization to inhalant allergens across Europe - A survey from the GA2LEN network. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;60(10):1287–300.
74. Choi IS, Koh YI, Koh JS, Lee MG. Sensitivity of the Skin Prick Test and Specificity of the Serum-Specific IgE Test for Airway Responsiveness to House Dust Mites in Asthma. *Journal of Asthma*. 2005;42(3):197–202.
75. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*. 2006;368(9537):804–13.
76. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet*. 2008;372(9643):1107–19.
77. Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008;178(3):218–24.
78. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010;181(4):315–23.
79. Fitzpatrick AM, Moore WC. Severe Asthma Phenotypes — How Should They Guide Evaluation and Treatment? *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2017;5(4):901–8.
80. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;127(2):355–60.

81. Stokes JR, Casale TB. Characterization of asthma endotypes: implications for therapy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2016;117(2):121–5.
82. Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper Type 2–driven Inflammation Defines Major Subphenotypes of Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009;180(5):388–95.
83. Liu T, Wu J, Zhao J, Wang J, Zhang Y, Liu L, et al. Type 2 innate lymphoid cells: A novel biomarker of eosinophilic airway inflammation in patients with mild to moderate asthma. *Respiratory Medicine*. 2015;109(11):1391–6.
84. Szeffler SJ, Phillips BR, Martinez FD, Chinchilli VM, Lemanske RF, Strunk RC, et al. Characterization of within-subject responses to fluticasone and montelukast in childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;115(2):233–42.
85. Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax*. 2007;62(12):1043–9.
86. Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine*. 2012;18(5):716–25.
87. Ray A, Kolls JK. Neutrophilic Inflammation in Asthma and Association with Disease Severity. *Trends Immunol*. 2017;38(12):942–54.
88. Hudey SN, Ledford DK, Cardet JC. Mechanisms of non-type 2 asthma. *Curr Opin Immunol*. 2020;66:123–8.
89. Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, Casale TB, et al. A new perspective on concepts of asthma severity and control. *European Respiratory Journal*. 2008;32(3):545–54.
90. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M, Schatz M, Li JT, Marcus P, et al. Development of the Asthma Control Test: A survey for assessing asthma control. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;113(1):59–65.
91. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *European Respiratory Journal*. 2014;43(2):343–73.
92. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: Role of age at onset and eosinophilic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;113(1):101–8.
93. Hastie AT, Moore WC, Meyers DA, Vestal PL, Li H, Peters SP, et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(5):1028.
94. Erzurum SC, Gaston BM. Biomarkers in Asthma. A Real Hope to Better Manage Asthma. *Clinics in Chest Medicine*. 2012;33(3):459–71.
95. Wenzel SE. Complex phenotypes in asthma: Current definitions. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 2013;26(6):710–5.
96. Ten Brinke A, Zwinderman AH, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001;164(5):744–8.
97. Bumbacea D, Campbell D, Nguyen L, Carr D, Barnes PJ, Robinson D, et al. Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. *European Respiratory Journal*. 2004;24(1):122–8.
98. Kim SH, Bae JS, Suh CH, Nahm DH, Holloway JW, Park HS. Polymorphism of tandem repeat in promoter of 5-lipoxygenase in ASA-intolerant asthma: A positive association with airway hyperresponsiveness. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;60(6):760–5.

Bibliografía

99. Brusselle GG, Maes T, Bracke KR. Eosinophils in the Spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nature Medicine*. 2013;19(8):977–9.
100. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *The Journal of Immunology*. 1995;154(9):4719–25.
101. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: Identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002;57(10):875–9.
102. Barbaro MPF, Spanevello A, Palladino GP, Salerno FG, Lacedonia D, Carpagnano GE. Exhaled matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in different biological phenotypes of asthma. *European Journal of Internal Medicine*. 2014;25(1):92–6.
103. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;160(5):1532–9.
104. Lugogo NL, Kraft M, Dixon AE. Does obesity produce a distinct asthma phenotype? *Journal of Applied Physiology*. 2010;108(3):729–34.
105. Holguin F, Bleeker ER, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Erzurum SC, et al. Obesity and asthma: An association modified by age of asthma onset. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;127(6).
106. Van Veen IH, Ten Brinke A, Sterk PJ, Rabe KF, Bel EH. Airway inflammation in obese and nonobese patients with difficult-to-treat asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;63(5):570–4.
107. Dixon AE, Pratley RE, Forgione PM, Kaminsky DA, Whittaker-Leclair LA, Griffes LA, et al. Effects of obesity and bariatric surgery on airway hyperresponsiveness, asthma control, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(3).
108. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Injection allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010;(8):CD001186.
109. Moreno C, Cuesta-Herranz J, Fernández-Távora L, Alvarez-Cuesta E. Immunotherapy safety: A prospective multi-centric monitoring study of biologically standardized therapeutic vaccines for allergic diseases. *Clinical and Experimental Allergy*. 2004;34(4):527–31.
110. Upham JW, le Lievre C, Jackson DJ, Masoli M, Wechsler ME, Price DB, et al. Defining a Severe Asthma Super-Responder: Findings from a Delphi Process. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021;9(11):3997–4004.
111. Pérez de Llano L, Dávila I, Martínez-Moragón E, Domínguez-Ortega J, Almonacid C, Colás C, et al. Development of a Tool to Measure the Clinical Response to Biologic Therapy in Uncontrolled Severe Asthma: The FEV1, Exacerbations, Oral Corticosteroids, Symptoms Score. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2021;9(7):2725–31.
112. Busse W, Corren J, Lanier BQ, McAlary M, Fowler-Taylor A, Cioppa G Della, et al. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001;108(2):184–90.
113. Strunk RC, Bloomberg GR. Omalizumab for Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(25):2689–95.
114. Bousquet J, Cabrera P, Berkman N, Buhl R, Holgate S, Wenzel S, et al. The effect of treatment with omalizumab, an anti-IgE antibody, on asthma exacerbations and emergency medical visits in patients with severe persistent asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;60(3):302–8.
115. Hanania NA, Alpan O, Hamilos DL, Condemi JJ, Reyes-Rivera I, Zhu J, et al. Omalizumab in severe allergic asthma inadequately controlled with standard therapy: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*. 2011;154(9):573–82.

116. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, et al. Dupilumab in Persistent Asthma with Elevated Eosinophil Levels. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(26):2455–66.
117. Castro M, Corren J, Pavord ID, Maspero J, Wenzel S, Rabe KF, et al. Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(26):2486–96.
118. Ortega HG, Yancey SW, Mayer B, Gunsoy NB, Keene ON, Bleecker ER, et al. Severe eosinophilic asthma treated with mepolizumab stratified by baseline eosinophil thresholds: a secondary analysis of the DREAM and MENSA studies. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2016;4(7):549–56.
119. Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): A multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2012;380(9842):651–9.
120. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(13):1198–207.
121. Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, Prazma CM, Keene ON, Yancey SW, et al. Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Mepolizumab in Eosinophilic Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(13):1189–97.
122. Castro M, Mathur S, Hargreave F, Boulet LP, Xie F, Young J, et al. Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: A randomized, placebo-controlled study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011;184(10):1125–32.
123. Bjermer L, Lemiere C, Maspero J, Weiss S, Zangrilli J, Germinaro M. Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma With Elevated Blood Eosinophil Levels: A Randomized Phase 3 Study. *Chest*. 2016;150(4):789–98.
124. Kupczyk M, Kuna P. Benralizumab: An anti-IL-5 receptor α monoclonal antibody in the treatment of asthma. *Immunotherapy*. 2018;10(5):349–59.
125. Kolbeck R, Kozhich A, Koike M, Peng L, Andersson CK, Damschroder MM, et al. MEDI-563, a humanized anti-IL-5 receptor α mAb with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(6):1344–53.
126. Bleecker ER, FitzGerald JM, Chanez P, Papi A, Weinstein SF, Barker P, et al. Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting β 2-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2016;388(10056):2115–27.
127. FitzGerald JM, Bleecker ER, Nair P, Korn S, Ohta K, Lommatzsch M, et al. Benralizumab, an anti-interleukin-5 receptor α monoclonal antibody, as add-on treatment for patients with severe, uncontrolled, eosinophilic asthma (CALIMA): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2016;388(10056):2128–41.
128. Nair P, Wenzel S, Rabe KF, Bourdin A, Lugogo NL, Kuna P, et al. Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Benralizumab in Severe Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(25):2448–58.
129. Drinkwater H. An Address on recent theories and experiments on heredity and inheritance. *The British Medical Journal*. 1908;2(2499):1538–41.
130. Rackemann FM. Studies in asthma: II. An analysis of two hundred and thirteen cases in which the patients were relieved for more than two years. *Archives of Internal Medicine*. 1928;41(3):346–69.
131. Hopp RJ, Bewtra AK, Watt GD, Nair NM, Townley RG. Genetic analysis of allergic disease in twins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1984;73(2):265–70.
132. Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *American Review of Respiratory Disease*. 1990;142(6):1351–8.
133. Nieminen MM, Kaprio J, Koskenvuo M. A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest*. 1991;100(1):70–5.

Bibliografía

134. Kumar A, Ghosh B. Genetics of asthma: A molecular biologist perspective. *Clinical and Molecular Allergy*. 2009;7(1):1–9.
135. Abdel-Aziz MI, Neerincx AH, Vijverberg SJ, Kraneveld AD, Maitland-van der Zee AH. Omics for the future in asthma. *Seminars in Immunopathology*. 2020;42(1):111–26.
136. Ober C, Yao TC. The genetics of asthma and allergic disease: A 21st century perspective. *Immunological Reviews*. 2011;242(1):10–30.
137. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature*. 2004;429(6990):446–52.
138. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996;273(5281):1516–7.
139. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(3):169–82.
140. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: A comprehensive review of the literature. *Respiratory Research*. 2003;4(1):14.
141. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: The long and winding road to gene discovery. *Genes and Immunity*. 2006;7(2):95–100.
142. Rolph MS, Sisavanh M, Liu SM, Mackay CR. Clues to asthma pathogenesis from microarray expression studies. *Pharmacology and Therapeutics*. 2006;109(1–2):284–94.
143. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(1):57–63.
144. Sîrbu A, Kerr G, Crane M, Ruskin HJ. RNA-Seq vs Dual- and Single-Channel Microarray Data: Sensitivity Analysis for Differential Expression and Clustering. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e50986.
145. Baye TM, Martin LJ, Khurana Hershey GK. Application of genetic/genomic approaches to allergic disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;126(3):425–36.
146. Hakonarson H, Bjornsdottir US, Halapi E, Bradfield J, Zink F, Mouy M, et al. Profiling of genes expressed in peripheral blood mononuclear cells predicts glucocorticoid sensitivity in asthma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(41):14789–94.
147. Izuhara K, Saito H. Microarray-based identification of novel biomarkers in asthma. *Allergology International*. 2006;55(4):361–7.
148. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JPA, et al. Genome-wide association studies for complex traits: Consensus, uncertainty and challenges. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(5):356–69.
149. Teo YY. Common statistical issues in genome-wide association studies: A review on power, data quality control, genotype calling and population structure. *Current Opinion in Lipidology*. 2008;19(2):133–43.
150. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*. 2002;418(6896):426–30.
151. Davis JS, Weiss ST, Tantisira KG. Asthma Pharmacogenomics: 2015 Update. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2015;15(7):42.
152. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: The inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2001;2:9–39.
153. Lin J. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Variability: A Daunting Challenge in Drug Therapy. *Current Drug Metabolism*. 2007;8(2):109–36.
154. Hawkins GA, Peters SP. Pharmacogenetics of asthma. *Methods in Molecular Biology*. 2008;448:359–78.
155. Liggett SB. Polymorphisms of adrenergic receptors: variations on a theme. *Assay Drug Dev Technol*. 2003;1(2):317–26.

156. Duroudier NP, Tulah AS, Sayers I. Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;64(6):823–39.
157. Tantisira KG, Lake S, Silverman EE, Palmer LJ, Lazarus R, Silverman EK, et al. Corticosteroid pharmacogenetics: Association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids. *Human Molecular Genetics*. 2004;13(13):1353–9.
158. Scott SA. Personalizing medicine with clinical pharmacogenetics. *Genetics in Medicine*. 2011;13(12):987–95.
159. Isidoro-García M, Sánchez-Martín A, García-Sánchez A, Sanz C, García-Berrocal B, Dávila I. Pharmacogenetics and the treatment of asthma. *Pharmacogenomics*. 2017;18(13):1271–80.
160. Diamant Z, Boot JD, Mantzouranis E, Flohr R, Sterk PJ, Gerth van Wijk R. Biomarkers in asthma and allergic rhinitis. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 2010;23(6):468–81.
161. Chung KF. Precision medicine in asthma: Linking phenotypes to targeted treatments. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2018;24(1):4–10.
162. Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019;144(1):1–12.
163. Muraro A, Lemanske RF, Hellings PW, Akdis CA, Bieber T, Casale TB, et al. Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis - PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;137(5):1347–58.
164. Schleich FN, Manise M, Sele J, Henket M, Seidel L, Louis R. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulm Med*. 2013;13(1):11.
165. Demarche SF, Schleich FN, Paulus VA, Henket MA, van Hees TJ, Louis RE. Is it possible to claim or refute sputum eosinophils $\geq 3\%$ in asthmatics with sufficient accuracy using biomarkers? *Respiratory Research*. 2017;18(1):1–6.
166. Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences*. 2011;87(8):463–85.
167. Hamelmann E, Gelfand EW. Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;120(1):8–16.
168. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, et al. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- α in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;10(5):471–80.
169. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, et al. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med*. 1994;179(2):703–8.
170. Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12(5):477–87.
171. Phillips C, Coward W, Pritchard D, Hewitt C. Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. *J Leukoc Biol*. 2003;73(1):165–71.
172. Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T. Invariant NKT Cells Biased for IL-5 Production Act as Crucial Regulators of Inflammation. *The Journal of Immunology*. 2007;179(6):3452–62.
173. Sitkauskiene B, Johansson AK, Sergejeva S, Lundin S, Sjöstrand M, Lötvall J. Regulation of bone marrow and airway CD34+ eosinophils by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30(3):367–78.

Bibliografía

174. Rådinger M, Lötval J. Eosinophil progenitors in allergy and asthma - do they matter? *Pharmacol Ther.* 2009;121(2):174–84.
175. Takatsu K. Interleukin 5 and B cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(1):25–35.
176. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(Suppl 2):S73–80.
177. Stern M, Meagher L, Savill J, Haslett C. Apoptosis in human eosinophils. Programmed cell death in the eosinophil leads to phagocytosis by macrophages and is modulated by IL-5. *The Journal of Immunology.* 1992;148(11):3543–9.
178. Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer RP. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *Journal of immunology.* 2000;164(7):3847–54.
179. Hellmich B, Csernok E, Gross WL. Proinflammatory cytokines and autoimmunity in Churg-Strauss syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:121–31.
180. Gevaert P, Lang-Loidolt D, Lackner A, Stammberger H, Staudinger H, Van Zele T, et al. Nasal IL-5 levels determine the response to anti-IL-5 treatment in patients with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(5):1133–41.
181. DeBrosse CW, Rothenberg ME. Allergy and Eosinophil-associated Gastrointestinal Disorders (EGID). *Curr Opin Immunol.* 2008;20(6):703–8.
182. Akuthota P, Weller PF. Eosinophils and Disease Pathogenesis. *Seminars in Hematology.* 2012;49(2):113–9.
183. Sehmi R, Wood LJ, Watson R, Foley R, Hamid Q, O’Byrne PM, et al. Allergen-induced increases in IL-5 receptor alpha-subunit expression on bone marrow-derived CD34+ cells from asthmatic subjects. A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation. *J Clin Invest.* 1997;100(10):2466–75.
184. Yoshimura-Uchiyama C, Yamaguchi M, Nagase H, Fujisawa T, Ra C, Matsushima K, et al. Comparative effects of basophil-directed growth factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;302(2):201–6.
185. Barretto KT, Brockman-Schneider RA, Kuipers I, Basnet S, Bochkov YA, Altman MC, et al. Human Airway Epithelial Cells Express a Functional IL-5 Receptor. *Allergy.* 2020;75(8):2127–30.
186. Lawrence MG, Teague WG, Feng X, Welch C, Etter E, Negri J, et al. Interleukin-5 receptor alpha (CD125) expression on human blood and lung neutrophils. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology.* 2022;128(1):53-60.e3.
187. Uniprot - IL5RA - Interleukin-5 receptor subunit alpha precursor - Homo sapiens (Human). Accedido 21 de diciembre de 2021, a partir de www.uniprot.org/uniprot/Q01344
188. Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific α chain and a β chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell.* 1991;66(6):1175–84.
189. Murata Y, Takaki S, Migita M, Kikuchi Y, Tominaga A, Takatsu K. Molecular cloning and expression of the human interleukin 5 receptor. *J Exp Med.* 1992;175(2):341–51.
190. Adachi T, Alam R. The mechanism of IL-5 signal transduction. *American Journal of Physiology.* 1998;275(3):C623-33.
191. Ishino T, Pasut G, Scibek J, Chaiken I. Kinetic interaction analysis of human interleukin 5 receptor alpha mutants reveals a unique binding topology and charge distribution for cytokine recognition. *J Biol Chem.* 2004;279(10):9547–56.
192. Kouro T, Kikuchi Y, Kanazawa H, Hirokawa K, Harada N, Shiiba M, et al. Critical proline residues of the cytoplasmic domain of the IL-5 receptor alpha chain and its function in IL-5-mediated activation of JAK kinase and STAT5. *Int Immunol.* 1996;8(2):237–45.

193. Isobe M, Kumura Y, Murata Y, Takaki S, Tominaga A, Takatsu K, et al. Localization of the gene encoding the alpha subunit of human interleukin-5 receptor (IL5RA) to chromosome region 3p24-3p26. *Genomics*. 1992;14(3):755–8.
194. Shen Y, Baker E, Callen DF, Sutherland GR, Willson TA, Rakar S, et al. Localization of the human GM-CSF receptor beta chain gene (CSF2RB) to chromosome 22q12.2-->q13.1. *Cytogenet Cell Genet*. 1992;61(3):175–7.
195. Tavernier J, Tuypens T, Plaetinck G, Verhee A, Fiers W, Devos R. Molecular basis of the membrane-anchored and two soluble isoforms of the human interleukin 5 receptor alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(15):7041–5.
196. Gregory B, Kirchem A, Phipps S, Gevaert P, Pridgeon C, Rankin SM, et al. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expr. *Journal of immunology*. 2003;170(11):5359–66.
197. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, Vrtis RF, Gern JE, Kita H, et al. Decreased Expression of Membrane IL-5 Receptor α on Human Eosinophils: II. IL-5 Down-Modulates Its Receptor Via a Proteinase-Mediated Process. *The Journal of Immunology*. 2002;169(11):6459–66.
198. Molfino N, Gossage D, Kolbeck R, Parker J, Geba G. Molecular and clinical rationale for therapeutic targeting of interleukin-5 and its receptor. *Clinical & Experimental Allergy*. 2012;42(5):712–37.
199. Sato S, Katagiri T, Takaki S, Kikuchi Y, Hitoshi Y, Yonehara S, et al. IL-5 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of SH2/SH3-containing proteins and activation of Bruton's tyrosine and Janus 2 kinases. *J Exp Med*. 1994;180(6):2101–11.
200. Pazdrak K, Olszewska-Pazdrak B, Stafford S, Garofalo RP, Alam R. Lyn, Jak2, and Raf-1 kinases are critical for the antiapoptotic effect of interleukin 5, whereas only Raf-1 kinase is essential for eosinophil activation and degranulation. *J Exp Med*. 1998;188(3):421–9.
201. Sano M, Leff AR, Myou S, Boetticher E, Meliton AY, Learoyd J, et al. Regulation of Interleukin-5-Induced beta2-Integrin Adhesion of Human Eosinophils by Phosphoinositide 3-Kinase. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2005;33(1):65–70.
202. Adachi T, Choudhury BK, Stafford S, Sur S, Alam R. The differential role of extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase in eosinophil functions. *Journal of immunology*. 2000;165(4):2198–204.
203. Huang CD, Wang CH, Liu CY, Lin SM, Chou CL, Liu WT, et al. Eosinophils from asthmatics release IL-5 in an autocrine fashion to prevent apoptosis through upregulation of Bcl-2 expression. *The Journal of asthma*. 2005;42(5):395–403.
204. Xu J, Jiang F, Nayeri F, Zetterström O. Apoptotic eosinophils in sputum from asthmatic patients correlate negatively with levels of IL-5 and eotaxin. *Respir Med*. 2007;101(7):1447–54.
205. Yasruel Z, Humbert M, Kotsimbos TC, Ploysongsang Y, Minshall E, Durham SR, et al. Membrane-bound and soluble alpha IL-5 receptor mRNA in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(4):1413–8.
206. Dorman SC, Efthimiadis A, Babirad I, Watson RM, Denburg JA, Hargreave FE, et al. Sputum CD34+IL-5Ralpha+ cells increase after allergen: evidence for in situ eosinophilopoiesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(5):573–7.
207. Tanaka H, Kawada N, Yamada T, Kawada K, Takatsu K, Nagai H. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in interleukin-5 receptor alpha chain-deficient mice. *Clinical and Experimental Allergy*. 2000;30(6):874–81.
208. Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Takatsu K, et al. Role of Interleukin-5 and Eosinophils in Allergen-Induced Airway Remodeling in Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2004;31(1):62–8.
209. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152 (5:2):77–121.

Bibliografía

210. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*. 1989;44(Suppl 10):1–59.
211. Alobid I, Antón E, Armengot M, Chao J, Colás C, del Cuvillo A, et al. SEAIC-SEORL. Consensus Document on Nasal Polyposis. POLINA Project. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2011;21(Suppl 1):1–58.
212. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology*. 2020;58(Suppl S29):1–464.
213. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An official ATS clinical practice guideline: Interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011;184(5):602–15.
214. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Accedido 17 de agosto de 2020, a partir de www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
215. Picard Tools - By Broad Institute. Accedido 28 de agosto de 2020, a partir de www.broadinstitute.github.io/picard/
216. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*. 2013;14(4):R36.
217. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv: Genomics*. 2013;n. pag.
218. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van Baren MJ, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*. 2010;28(5):511–5.
219. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166–9.
220. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 2014;15(12):550.
221. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289–300.
222. Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(Web Server issue):W305-11.
223. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS : a Journal of Integrative Biology*. 2012;16(5):284.
224. Poswar F de O, Farias LC, Fraga CA de C, Bambirra W, Brito-Júnior M, Sousa-Neto MD, et al. Bioinformatics, Interaction Network Analysis, and Neural Networks to Characterize Gene Expression of Radicular Cyst and Periapical Granuloma. *Journal of Endodontics*. 2015;41(6):877–83.
225. STRING: functional protein association networks. Accedido 13 de octubre de 2020, a partir de www.string-db.org
226. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Accedido 15 de noviembre de 2020, a partir de www.genome.jp/kegg/
227. Home - Reactome Pathway Database. Accedido 15 de noviembre de 2020, a partir de www.reactome.org
228. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009;55(4):611–22.
229. Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity. Technical note.
230. Primer3.0. Accedido 6 de marzo de 2018, a partir de www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/

231. UCSC Genome Browser Home. www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/. Accedido 6 de marzo de 2018, a partir de www.genome.ucsc.edu/
232. Beacon Designer. Accedido 6 de marzo de 2018, a partir de www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1
233. Livak K, Schmittgen T. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. 2004.
234. Swets JA. Measuring the Accuracy of Diagnostic Systems. *Science* (1979). 1988;240(4857):1285–93.
235. Pascual M, Roa S, García-Sánchez A, Sanz C, Hernandez-Hernandez L, Grealley JM, et al. Genome-wide expression profiling of B lymphocytes reveals IL4R increase in allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;134(4):972–5.
236. Sandeep T, Roopakala MS, Silvia CRWD, Chandrashekara S, Rao M. Evaluation of serum immunoglobulin E levels in bronchial asthma. *Lung India : Official Organ of Indian Chest Society*. 2010;27(3):138.
237. Van Ganse E, Antonicelli L, Zhang Q, Laforest L, Yin DD, Nocea G, et al. Asthma-related resource use and cost by GINA classification of severity in three European countries. *Respiratory Medicine*. 2006;100(1):140–7.
238. Pelta Fernández R, De Miguel Díez J, Álvarez-Perea A, Magán Tapia P, Jiménez García R, Sanz De Burgoa Gómez-Piñán V. Factores de riesgo de asma de inicio entre los 12 y 40 años. Resultados del estudio FENASMA. *Archivos de Bronconeumología*. 2011;47(9):433–40.
239. Derendorf H, Daley-Yates PT, Pierre LN, Efthimiou J. Systemic bioavailability of inhaled steroids: the importance of appropriate and comparable methodology. *Eur Respir J*. 2001;17(1):157–8.
240. Isidoro-García M, García-Sánchez A, Sanz C, Estravís M, Marcos-Vadillo E, Pascual M, et al. YRNAs overexpression and potential implications in allergy. *World Allergy Organization Journal*. 2019;12(8):100047.
241. Chua JC, Douglass JA, Gillman A, O’Hehir RE, Meeusen EN. Galectin-10, a Potential Biomarker of Eosinophilic Airway Inflammation. *PLoS One*. 2012;7(8):e42549.
242. Nyenhuis S, Alumkal P, Du J, Maybruck B, Vinicky M, Ackerman S. Charcot-Leyden crystal protein/galectin-10 is a surrogate biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthma. *Biomark Med*. 2019;13(9):715–24.
243. Devouassoux G, Pachot A, Laforest L, Diasparra J, Freymond N, Ganse E Van, et al. Galectin-10 mRNA is overexpressed in peripheral blood of aspirin-induced asthma. *Allergy*. 2008;63(1):125–31.
244. Chu H, Balzar S, Westcott J, Trudeau J, Sun Y, Conrad D, et al. Expression and activation of 15-lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition. *Clinical and experimental allergy*. 2002;32(11):1558–65.
245. Song Y, Yang E, Kim S, Jin H, Park H. Effect of genetic polymorphism of ALOX15 on aspirin-exacerbated respiratory disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;159(2):157–61.
246. Yan B, Wang Y, Li Y, Wang C, Zhang L. Inhibition of arachidonate 15-lipoxygenase reduces the epithelial-mesenchymal transition in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(3):270–80.
247. O’Reilly M, Alpert R, Jenkinson S, Gladue RP, Foo S, Trim S, et al. Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis. *J Recept Signal Transduct Res*. 2002;22(1:4):431–48.
248. Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *British Journal of Pharmacology*. 2004;142(1):161–71.
249. Yahara H, Satoh T, Miyagishi C, Yokozeki H. Increased expression of CRTH2 on eosinophils in allergic skin diseases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2010;24(1):75–6.

Bibliografía

250. Fajt ML, Gelhaus SL, Freeman B, Uvalle CE, Trudeau JB, Holguin F, et al. Prostaglandin D2 pathway upregulation: Relation to asthma severity, control, and TH2 inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(6):1504–12.
251. García-Sánchez A, Estravís M, Martín MJ, Pérez-Pazos J, Martín-García C, Gil-Melcón M, et al. PTGDR2 expression in peripheral blood as a potential biomarker in adult patients with asthma. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11(9):827.
252. Shao Z, Bharadwaj AS, McGee HS, Makinde TO, Agrawal DK. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand increases a lung DC subset with regulatory properties in allergic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009;123(4):917-924.e2.
253. Park SC, Shim D, Kim H, Bak Y, Choi DY, Yoon JH, et al. Fms-Like Tyrosine Kinase 3-Independent Dendritic Cells Are Major Mediators of Th2 Immune Responses in Allergen-Induced Asthmatic Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(24):9508.
254. Kruzel ML, Bacsí A, Choudhury B, Sur S, Boldogh I. Lactoferrin decreases pollen antigen-induced allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology*. 2006;119(2):159–66.
255. Bournazou I, Mackenzie KJ, Duffin R, Rossi AG, Gregory CD. Inhibition of eosinophil migration by lactoferrin. *Immunology and Cell Biology*. 2010;88(2):220–3.
256. Prikk K, Maisi P, Pirilä E, Reintam M, Salo T, Sorsa T, et al. Airway obstruction correlates with collagenase-2 (MMP-8) expression and activation in bronchial asthma. *Lab Invest*. 2002;82(11):1535–45.
257. Kelly E, Busse W, Jarjour N. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3):1157–61.
258. Suzuki R, Kato T, Miyazaki Y, Iwata M, Noda Y, Takagi K, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in sputum from patients with bronchial asthma. *J Asthma*. 2001;38(6):477–84.
259. Cataldo D, Bettiol J, Noël A, Bartsch P, Foidart J, Louis R. Matrix metalloproteinase-9, but not tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, increases in the sputum from allergic asthmatic patients after allergen challenge. *Chest*. 2002;122(5):1553–9.
260. Ventura I, Vega A, Chacón P, Chamorro C, Aroca R, Gómez E, et al. Neutrophils from allergic asthmatic patients produce and release metalloproteinase-9 upon direct exposure to allergens. *Allergy*. 2014;69(7):898–905.
261. Hassan N, Mohamed-Hussein A, Mohamed E, Mohamed O, Mohamed H, Tammam M. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) as non-invasive biomarkers of remodelling in asthma. *European Respiratory Journal*. 2015;46(Suppl 59):OA1467.
262. North ML, Khanna N, Marsden PA, Grasemann H, Scott JA. Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma. *American Physiological Society*. 2009;296(6):911–20.
263. Maarsingh H, Zaagsma J, Meurs H. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. *British Journal of Pharmacology*. 2009;158(3):652.
264. Watt AP, Schock BC, Ennis M. Neutrophils and eosinophils: Clinical implications of their appearance, presence and disappearance in asthma and COPD. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*. 2005;4(4):415–23.
265. Lu Y, Sjöstrand M, Malmhäll C, Rådinger M, Jeurink P, Lötvall J, et al. New Production of Eosinophils and the Corresponding Th1/Th2 Balance in the Lungs after Allergen Exposure in BALB/c and C57BL/6 Mice. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2010;71(3):176–85.
266. Jiang Y, Gruziova O, Wang T, Forno E, Boutaoui N, Sun T, et al. Transcriptomics of atopy and atopic asthma in white blood cells from children and adolescents. *European Respiratory Journal*. 2019;53(5):1900102.

267. Lemonnier N, Melén E, Jiang Y, Joly S, Ménard C, Aguilar D, et al. A novel whole blood gene expression signature for asthma, dermatitis, and rhinitis multimorbidity in children and adolescents. *Allergy*. 2020;75(12):3248–60.
268. Virkud Y V., Kelly RS, Croteau-Chonka DC, Celedón JC, Dahlin A, Avila L, et al. Novel eosinophilic gene expression networks associated with IgE in two distinct asthma populations. *Clinical and Experimental Allergy*. 2018;48(12):1654–64.
269. Choy DF, Jia G, Abbas AR, Morshead KB, Lewin-Koh N, Dua R, et al. Peripheral blood gene expression predicts clinical benefit from anti-IL-13 in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;138(4):1230-1233.e8.
270. Nie X, Wei J, Hao Y, Tao J, Li Y, Liu M, et al. Consistent Biomarkers and Related Pathogenesis Underlying Asthma Revealed by Systems Biology Approach. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(16):4037.
271. Singh P, Sharma A, Jha R, Arora S, Ahmad R, Rahmani AH, et al. Transcriptomic analysis delineates potential signature genes and miRNAs associated with the pathogenesis of asthma. *Scientific Reports*. 2020;10(1):13354.
272. Bigler J, Boedigheimer M, Schofield JPR, Skipp PJ, Corfield J, Rowe A, et al. A severe asthma disease signature from gene expression profiling of peripheral blood from U-BIOPRED cohorts. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2017;195(10):1311–20.
273. Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: From discovery to therapy. *International Immunology*. 2009;21(12):1303–9.
274. Brussino L, Heffler E, Bucca C, Nicola S, Rolla G. Eosinophils Target Therapy for Severe Asthma: Critical Points. *BioMed Research International*. 2018;2018:7582057.
275. Persson T, Monsef N, Andersson P, Bjartell A, Malm J, Calafat J, et al. Expression of the neutrophil-activating CXC chemokine ENA-78/CXCL5 by human eosinophils. *Clinical & Experimental Allergy*. 2003;33(4):531–7.
276. Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical & Experimental Allergy*. 2009;39(12):1786–800.
277. Basu S, Dittel BN. Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) immune regulation in health and disease. *Immunologic Research*. 2011;51(1):26–38.
278. Domingo C, Palomares O, Sandham DA, Erpenbeck VJ, Altman P. The prostaglandin D2 receptor 2 pathway in asthma: A key player in airway inflammation. *Respiratory Research*. 2018;19(1):189.
279. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP Kinases in the Immune Response. *Annual Review of Immunology*. 2003;20:55–72.
280. Sridhar S, Liu H, Pham TH, Damera G, Newbold P. Modulation of blood inflammatory markers by benralizumab in patients with eosinophilic airway diseases. *Respiratory Research*. 2019;20(1):14.
281. Nakajima M, Matsuyama M, Arai N, Yamada H, Hyodo K, Nonaka M, et al. Identification of whole blood gene expressions correlated with responsiveness to benralizumab. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;147(2):772-75.
282. Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D. Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? *Allergy*. 2002;57(7):607–13.
283. Pakkasela J, Ilmarinen P, Honkamäki J, Tuomisto LE, Andersén H, Piirilä P, et al. Age-specific incidence of allergic and non-allergic asthma. *BMC Pulmonary Medicine*. 2020;20(1):1–9.
284. Settipane GA, Chafee FH. Nasal polyps in asthma and rhinitis A review of 6,037 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 1977;59(1):17–21.
285. Larsen K, Tos M. The estimated incidence of symptomatic nasal polyps. *Acta Oto-Laryngologica*. 2002;122(2):179–82.
286. Collins MM, Pang YT, Loughran S, Wilson JA. Environmental risk factors and gender in nasal polyposis. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*. 2002;27(5):314–7.

Bibliografía

287. Maniscalco M, Calabrese C, D'Amato M, Guida P, Molino A, Aliani M, et al. Association between exhaled nitric oxide and nasal polyposis in severe asthma. *Respiratory Medicine*. 2019;152:20–4.
288. Ledford R. Adult Asthma. In: Mahmoudi M, editor. *Allergy and Asthma The Basics to Best Practices*. Springer; 2019. p. 289–304.
289. Grigoreas C, Vourdas D, Petalas K, Simeonidis G, Demeroutis I, Tsioulos T. Nasal polyps in patients with rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Proc*. 2002;23(3):169–74.
290. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: A distinct clinical and pathologic phenotype. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007;119(5):1043–52.
291. Calderón MA, Cox L, Casale TB, Moingeon P, Demoly P. Multiple-allergen and single-allergen immunotherapy strategies in polysensitized patients: Looking at the published evidence. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):929–34.
292. Miguères M, Dávila I, Frati F, Azpeitia A, Jeanpetit Y, Lhéritier-Barrand M, et al. Types of sensitization to aeroallergens: definitions, prevalences and impact on the diagnosis and treatment of allergic respiratory disease. *Clinical and Translational Allergy*. 2014;4(1):16.
293. Bousquet PJ, Chinn S, Janson C, Kogevinas M, Burney P, Jarvis D. Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy*. 2007;62(3):301–9.
294. Calabria CW, Dice JP, Hagan LL. Prevalence of positive skin test responses to 53 allergens in patients with rhinitis symptoms. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2007;28(4):442–8.
295. Rajan JP, Wineinger NE, Stevenson DD, White AA. Prevalence of aspirin-exacerbated respiratory disease among asthmatic patients: A meta-analysis of the literature. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;135(3):676–681.e1.
296. Rial MJ, Álvarez-Puebla MJ, Arismendi E, Caballero ML, Cañas JA, Cruz MJ, et al. Clinical and inflammatory characteristics of patients with asthma in the Spanish MEGA project cohort. *Clinical and Translational Allergy*. 2021;11(1):e12001.
297. Garín L, Armengot Carceller M, Alba JR, Carda C. Correlaciones entre aspectos clínicos e histológicos en la poliposis nasal. *Acta Otorrinolaringológica Española*. 2008;59(7):315–20.
298. Laidlaw TM, Mullol J, Woessner KM, Amin N, Mannent LP. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps and Asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2021;9(3):1133–41.
299. Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clinical & Experimental Allergy*. 2003;33(12):1622–8.
300. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, et al. Evidence That Severe Asthma Can Be Divided Pathologically into Two Inflammatory Subtypes with Distinct Physiologic and Clinical Characteristics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;160(3):1001–8.
301. Canova C, Heinrich J, Anto JM, Leynaert B, Smith M, Kuenzli N, et al. The influence of sensitisation to pollens and moulds on seasonal variations in asthma attacks. *European Respiratory Journal*. 2013;42(4):935–45.
302. Suzuki Y, Wakahara K, Nishio T, Ito S, Hasegawa Y. Airway basophils are increased and activated in eosinophilic asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017;72(10):1532–9.
303. Gevaert P, Hellman C, Lundblad L, Lundahl J, Holtappels G, van Cauwenberge P, et al. Differential expression of the interleukin 5 receptor alpha isoforms in blood and tissue eosinophils of nasal polyp patients. *Allergy*. 2009;64(5):725–32.
304. Namkung JH, Lee JE, Kim E, Cho HJ, Kim S, Shin ES, et al. IL-5 and IL-5 receptor alpha polymorphisms are associated with atopic dermatitis in Koreans. *Allergy*. 2007;62(8):934–42.
305. Losol P, Kim SH, Shin YS, Ye YM, Park HS. A genetic effect of IL-5 receptor α polymorphism in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *Exp Mol Med*. 2013;45(3):e14.

306. Wilson TM, Maric I, Shukla J, Brown M, Santos C, Simakova O, et al. Interleukin-5 receptor α levels in patients with marked eosinophilia or mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(5):1086–92.
307. Johansson MW. Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. 2014;44(4):482–98.
308. Liu LY, Sedgwick JB, Bates ME, Vrtis RF, Gern JE, Kita H, et al. Decreased Expression of Membrane IL-5 Receptor α on Human Eosinophils: I. Loss of Membrane IL-5 Receptor α on Airway Eosinophils and Increased Soluble IL-5 Receptor α in the Airway After Allergen Challenge. *The Journal of Immunology*. 2002;169(11):6452–8.
309. Wadsworth SJ, Sin D, Dorscheid D. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. *Journal of Asthma and Allergy*. 2011;4:77–86.
310. Hanania NA, Diamant Z. The road to precision medicine in asthma: Challenges and opportunities. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2018;24(1):1–3.
311. Goldman M, Hirsch I, Zangrilli JG, Newbold P, Xu X. The association between blood eosinophil count and benralizumab efficacy for patients with severe, uncontrolled asthma: subanalyses of the Phase III SIROCCO and CALIMA studies. *Current Medical Research and Opinion*. 2017;33(9):1605–13.
312. Bai TR, Vonk JM, Postma DS, Boezen HM. Severe exacerbations predict excess lung function decline in asthma. *European Respiratory Journal*. 2007;30(3):452–6.
313. Hoyte FCL, Gross LM, Katial RK. Exhaled Nitric Oxide: An Update. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2018;38(4):573–85.
314. Pelaia C, Crimi C, Benfante A, Caiaffa MF, Calabrese C, Carpagnano GE, et al. Therapeutic Effects of Benralizumab Assessed in Patients with Severe Eosinophilic Asthma: Real-Life Evaluation Correlated with Allergic and Non-Allergic Phenotype Expression. *J Asthma Allergy*. 2021;14:163–73.
315. Sordillo JE, Webb T, Kwan D, Kamel J, Hoffman E, Milton DK, et al. Allergen exposure modifies the relation of sensitization to fraction of exhaled nitric oxide levels in children at risk for allergy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;127(5):1165-1172.e5.
316. Chipps BE, Newbold P, Hirsch I, Trudo F, Goldman M. Benralizumab efficacy by atopy status and serum immunoglobulin E for patients with severe, uncontrolled asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2018;120(5):504-511.e4.

ANEXO

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, parte de los resultados obtenidos han sido objeto de las siguientes publicaciones:

- Artículo. **Elena-Pérez S**, Heredero-Jung DH, García-Sánchez A, Estravís M, Martín MJ, Ramos-González J, Triviño JC, Isidoro-García M, Sanz C and Dávila I. Molecular analysis of IL-5 receptor subunit alpha as a possible pharmacogenetic biomarker in asthma. *Frontiers in Medicine*. 2021;7:624576. doi: 10.3389/fmed.2020.624576.
- Comunicación tipo póster. 32º Congreso Virtual de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC). Noviembre de 2020.
García-Sánchez A, Sanabria-Luis C, **Elena-Pérez S**, Heredero-Jung DH, Sanz C y Dávila I. Estudio de expresión de *IL5R α* y *CRTH2* en sangre periférica de un paciente tratado secuencialmente con omalizumab, mepolizumab y benralizumab.
- Comunicación tipo póster. Virtual Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI). Febrero-Marzo de 2021.
Elena-Pérez S, Heredero-Jung DH, García-Sánchez A, Estravís M, Martín MJ, Muñoz-Bellido F, Isidoro-García M, Sanz C and Dávila I. IL-5 receptor subunit alpha as a possible biomarker in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2021;147(2)AB245. doi: 10.1016/j.jaci.2020.12.039.
- Comunicación tipo póster. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Hybrid Congress (EAACI). Julio de 2021.
Heredero-Jung DH, **Elena-Pérez S**, García-Sánchez A, Estravís M, Martín MJ, Muñoz-Bellido F, Isidoro-García M, Sanz C and Dávila I. Co-expression of *IL5RA* and *PTGDR2* in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Synergy of two biomarkers. *Allergy*. 2021;76(Suppl 110):654. doi: 10.1111/all.15093.



Molecular Analysis of IL-5 Receptor Subunit Alpha as a Possible Pharmacogenetic Biomarker in Asthma

Sandra Elena-Pérez¹, David Hansoe Heredero-Jung¹, Asunción García-Sánchez^{2,3,4}, Miguel Estravís^{2,3,4}, María J. Martín^{2,4}, Jacinto Ramos-González⁵, Juan Carlos Triviño⁶, María Isidoro-García^{1,2,4,7}, Catalina Sanz^{2,4,8*} and Ignacio Dávila^{2,3,4,9}

¹ Department of Clinical Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, ² Allergic Disease Research Group IIMD-01, Institute for Biomedical Research of Salamanca, Salamanca, Spain, ³ Department of Biomedical Sciences and Diagnostics, University of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁴ Network for Cooperative Research in Health - RETICS ARADyAL, Carlos III Health Institute, Madrid, Spain, ⁵ Department of Pneumology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁶ Sistemas Genómicos, Paterna, Spain, ⁷ Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁸ Department of Microbiology and Genetics, University of Salamanca, Salamanca, Spain, ⁹ Department of Allergy, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Bassam Mahboub,
Rashid Hospital, United Arab Emirates

Reviewed by:

Ubaldo Martin,
AstraZeneca, United States
Jose Antonio Cañas,
Health Research Institute Foundation
Jimenez Diaz (IIS-FJD), Spain

*Correspondence:

Catalina Sanz
catsof@usal.es

Specialty section:

This article was submitted to
Pulmonary Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 31 October 2020

Accepted: 30 December 2020

Published: 11 February 2021

Citation:

Elena-Pérez S, Heredero-Jung DH, García-Sánchez A, Estravís M, Martín MJ, Ramos-González J, Triviño JC, Isidoro-García M, Sanz C and Dávila I (2021) Molecular Analysis of IL-5 Receptor Subunit Alpha as a Possible Pharmacogenetic Biomarker in Asthma. *Front. Med.* 7:624576. doi: 10.3389/fmed.2020.624576

Background: Asthma is a heterogeneous syndrome with a broad clinical spectrum and high drug response variability. The inflammatory response in asthma involves multiple effector cells and mediator molecules. Based on asthma immunopathogenesis, precision medicine can be a promising strategy for identifying biomarkers. Biologic therapies acting on the IL-5/IL-5 receptor axis have been developed. IL-5 promotes proliferation, differentiation and activation of eosinophils by binding to the IL-5 receptor, located on the surface of eosinophils and basophils. This study aimed to investigate the expression of *IL5RA* in patients with several types of asthma and its expression after treatment with benralizumab, a biologic directed against IL-5 receptor subunit alpha.

Methods: Sixty peripheral blood samples, 30 from healthy controls and 30 from asthmatic patients, were selected for a transcriptomic RNAseq study. Differential expression analysis was performed by statistical assessment of fold changes and *P*-values. A validation study of *IL5RA* expression was developed using qPCR in 100 controls and 187 asthmatic patients. The effect of benralizumab on *IL5RA* expression was evaluated in five patients by comparing expression levels between pretreatment and after 3 months of treatment. The *IL5RA* mRNA levels were normalized to *GAPDH* and *TBP* expression values for each sample. Calculations were made by the comparative $\Delta\Delta C_t$ method. All procedures followed the MIQE guidelines.

Results: *IL5RA* was one of the most differentially overexpressed coding transcripts in the peripheral blood of asthmatic patients ($P = 8.63E-08$ and fold change of 2.22). In the qPCR validation study, *IL5RA* expression levels were significantly higher in asthmatic patients than in controls ($P < 0.001$). Significant expression differences were present in different asthmatic types. In the biological drug study, patients treated with benralizumab showed a significant decrease in *IL5RA* expression and blood eosinophil counts. A notable improvement in ACT and lung function was also observed in these patients.

Conclusions: These results indicate that *IL5RA* is overexpressed in patients with different types of asthma. It could help identify which asthmatic patients will respond more efficiently to benralizumab, moving toward a more personalized asthma management. Although further studies are required, *IL5RA* could play a role as a biomarker and pharmacogenetic factor in asthma.

Keywords: asthma, pharmacogenetic biomarker, transcriptomic, *IL5RA*, benralizumab, precision medicine

INTRODUCTION

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways affecting more than 300 million people worldwide, and its prevalence is increasing, becoming a health and economic problem (1). It is defined by variable expiratory airflow limitation and respiratory symptoms such as wheeze, cough and shortness of breath, which vary in frequency and intensity (2). Asthma is recognized as a heterogeneous syndrome with different underlying disease processes, determined by complex interactions between genetic and environmental factors. This variety of interactions results in different clinical presentations, phenotypes and response to treatment (3).

Despite the broad clinical spectrum of asthma, the presence of inflammation of the airway is a common pathologic feature and the primary treatment target. Nevertheless, the relationship between the intensity of inflammation and the severity of asthma has not been consistently established (4). The characteristic inflammatory pattern in most asthmatic patients includes an increase in type 2 helper T (Th2) lymphocytes, eosinophils, basophils, mast cells and type 2 innate lymphoid cells (ILC2). These effector cells release numerous mediating molecules that cause disease symptoms (5). Type 2 inflammation is characterized by an increase in type 2 cytokines, particularly IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13, involved in eosinophil activation and immunoglobulin E production (6).

Asthma comprises different phenotypes with similar clinical manifestations but probably involving different underlying mechanisms (7). These phenotypes have been characterized based on the age of onset of disease, clinical presentation, severity and presence of other disorders such as atopy and eosinophilia (8–10). Eosinophilic asthma is the best-studied inflammatory phenotype and is characterized by elevated eosinophils in peripheral blood and sputum. Patients in whom eosinophilic inflammation persists despite treatment with high doses of corticosteroids are often associated with more severe asthma and a higher risk of exacerbations (11, 12). Therefore, phenotype characterization in patients with severe uncontrolled or poorly controlled asthma could help in guiding specific treatments (13).

Asthma management aims to achieve and maintain control of the disease and reduce the risk of exacerbations. Understanding the underlying pathophysiologic mechanisms is necessary for stratifying patients toward individualized therapy. The implementation of precision medicine requires identifying specific biomarkers easily measurable in biological fluids, which can help in evaluating treatment effectiveness (14, 15). In this context, new biologic therapies are being developed targeting

cytokines and their receptors. IL-5 plays a crucial role in eosinophilic asthma pathophysiology and has been proposed as a novel therapeutic target. This cytokine is involved in the proliferation, differentiation, survival and activation of eosinophils by binding to the IL-5 receptor, located on the surface of eosinophils and basophils (16, 17). The IL-5 receptor is a heterodimer comprising one alpha subunit (IL-5RA) and one beta subunit, also found in both IL-3 and GM-CSF receptors (18).

In recent years, new drugs based on monoclonal antibodies have been developed against the action of IL-5 in eosinophil-mediated inflammation. Benralizumab is a humanized IgG1κ monoclonal antibody that binds to IL-5RA via its Fab domain with high affinity and specificity, blocking IL-5 signaling (19). Besides, this antibody can bind through its afucosylated Fc domain to the Fcγ receptor IIIa, expressed on the surface of natural killer cells, macrophages and neutrophils, thus inducing antibody-directed cell-mediated cytotoxicity of eosinophils and basophils. As a result, the administration of benralizumab results in a dramatic depletion of eosinophils counts in blood, sputum, airway mucosa and bone marrow (20). In this context, benralizumab has proved effectivity in treating patients with severe eosinophilic asthma, improving lung function and asthma control and reducing the rate of exacerbations (21).

The present study aims to investigate the expression of *IL5RA* in patients with different types of asthma and its role as a possible biomarker of response to treatment with benralizumab.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

The study involved 347 unrelated Caucasian individuals, 130 controls and 217 asthmatic patients, from the Allergy Department of the University Hospital of Salamanca. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL) (PI 2020-02-433) and all participants signed a written informed consent. Controls had to fulfill the following criteria: (i) no symptoms or history of asthma, rhinitis or other pulmonary diseases; (ii) no symptoms or history of allergic diseases; (iii) negative skin prick tests with a battery of locally adapted common aeroallergens; (iv) absence of family history of asthma, rhinitis or atopy; and (v) age >16 years old. Asthmatic patients were recruited if they met all the following criteria: (i) at least two symptoms consistent with asthma (cough, wheeze and dyspnea); (ii) either a positive bronchodilator or methacholine test; and (iii) absence of other pulmonary disorders; and (iv) age >16 years old.

Lung function was measured by spirometry according to the American Thoracic Society (ATS) criteria (22). Asthma severity was established following the Spanish Guide for the Management of Asthma (GEMA) guidelines (7) and severe asthma was diagnosed according to the ERS/ATS criteria (23). Skin prick tests were performed with a battery of common aeroallergens (24), according to The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) recommendations (25). Skin tests were considered positive if there was at least one wheal reaction of >3 mm of diameter. Patients were considered atopic if they had a positive skin prick test to at least one allergen. Patients were considered monosensitized if they had a positive skin prick test result to only one group of aeroallergens (pollens, mites, molds or animal dander) and polysensitized if they had positive skin tests for two or more groups. Early-onset asthma was defined as the presence of asthma symptoms that appeared before 18 years, and late-onset asthma was defined as the presence after the age of 18 years (26). Asthmatic patients were classified into two subgroups, eosinophilic and non-eosinophilic asthma, according to the number of eosinophils (cut-off point of 150 cells per μl) (2). Blood cell counts were determined on the XN-1000 hematology analyzer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) and total serum IgE levels were measured using a fluoroenzyme immunoassay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Transcriptomic RNAseq Study

A total of 60 peripheral blood samples, 30 from healthy controls and 30 from patients with pollen allergic asthma, were selected for a transcriptomic RNAseq study. Total RNA extraction was performed using the Ambion RiboPureTM-Blood kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After Ambion DNase I treatment (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), RNA was purified and concentrated with the RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany). All purification protocols were performed with the modifications indicated by the manufacturers. RNA was quantified by Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA integrity number (RIN) algorithm was used to determine RNA quality on the Agilent 2100 Bioanalyzer using the Eukaryote Total RNA Nano kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). RNA samples with a RIN value above 8 were used. Globin transcripts and ribosomal RNA were removed, and RNA was cleaved to prepare RNA strand-specific libraries. Finally, the generated libraries were sequenced on the Illumina HiSeq 2500 platform (Illumina, San Diego, CA, USA).

Bioinformatic Analysis

In the bioinformatic analysis of the transcriptomic data, the FastQC software (27) was used to analyze the quality of raw reads. Sequencing reads were mapped on the human reference genome (GRCh38) using the TopHat2 software (28). The low-quality readings were removed with Picard Tools (29) and the unmapped and non-properly paired reads were re-mapped using the BWA-MEM algorithm (30). Gene and isoform prediction were estimated using the Cufflinks method (31). The HTSeq software (v.0.6.0) (32) was used to calculate gene expression levels. Differential expression analysis was performed by DESeq2

package (33) and only the transcripts with a fold change value ≥ 1.5 or ≤ -1.5 and a FDR-adjusted P -value < 0.05 were considered as differentially expressed genes. Potential interactions between selected proteins were examined by cluster analysis using the STRING software (34), a database which include functional and physical associations between known and predicted proteins.

qPCR Validation Assays

For the validation of the transcriptomic gene expression data, 287 peripheral blood samples were selected including 100 samples from controls and 187 from asthmatic patients. Total RNA was isolated using the RiboPure-Blood kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). DNase treatment was performed using Ambion DNase I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Concentrations and RNA quality ratios were determined in a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). cDNA was generated from 500 ng of total RNA using Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), in a final volume of 20 μl . Conditions for PCR included a single cycle and incubation periods of 65°C for 5 min, 25°C for 10 min, 50°C for 50 min, 85°C for 5 min, and 37°C for 20 min.

qPCR reactions were performed in a LightCycler480 system (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). *IL5RA* primers were designed using Primer 3.0 (35) and the Beacon Designer (36) software. *GAPDH* and *TBP* reference gene primers were chosen from The Real Time ready Human Reference GenePanel (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). The sequence of the primers used are shown in **Table 1**. Primers efficacies were analyzed by amplifying serial dilutions of cDNA sample of known concentration and according to the following equation: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. All efficiencies ranged from 90 to 110%. The reaction mixture in each well-contained a final volume of 15 μl based on 7.5 μl of Master Mix SYBR Green I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), 10 μM of each primers and 20 ng of cDNA. All reactions were performed in triplicate. In each experiment, non-template controls and calibrator were included. The PCR conditions included 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 10 s at 95°C for denaturation, 10 s at 60°C for annealing and 10 s at 72°C for polymerization. Finally, melting curve analyses were carried out to verify the specificity of the qPCR products. *IL5RA* mRNA levels were normalized to *GAPDH* and *TBP* expression levels

TABLE 1 | Sequences of primers used in the qPCR assay.

	Primer	Sequence 5' → 3'
<i>IL5RA</i>	Forward	TGAAAGAGTGAAGAACCGCC
	Reverse	CCTGGCCTGAGAATGCG
<i>GAPDH</i>	Forward	CTCTGCTCCTCTGTTTCGAC
	Reverse	ACGACCAAATCCGTTGACTC
<i>TBP</i>	Forward	GAACATCATGGATCAGAACACA
	Reverse	ATAGGGATTCCGGGAGTCAT

TABLE 2 | Characteristics of the study population in the RNAseq study and the validation analyses.

	N	Sex (% Female)	Age (Mean ± SD)	FeNO, ppb (Mean ± SD)	IgE, kU/l (Median ± IQR)
RNAseq study					
Controls	30	46.7	57 ± 17	-	46.7 ± 87.8
Asthmatic patients	30	56.7	30 ± 13	-	179.0 ± 239.0
Validation analysis					
Controls	100	66.0	57 ± 17	-	28.8 ± 57.7
Asthmatic patients	187	55.1	45 ± 19	44.8 ± 48.3	174.0 ± 398.2
Non-allergic asthma (NAA)	76	60.5	58 ± 15	38.1 ± 40.6	77.0 ± 118.8
NAA without NP	33	72.7	56 ± 16	24.8 ± 19.3	37.9 ± 103.5
NAA with NP	43	51.2	61 ± 14	52.2 ± 51.7	83.0 ± 258.7
Allergic asthma (AA)	111	51.4	35 ± 16	49.8 ± 53.0	312.5 ± 472.3
AA without NP	82	57.3	31 ± 14	39.8 ± 29.5	312.5 ± 445.5
AA with NP	29	34.5	46 ± 17	79.6 ± 88.7	307.0 ± 747.0
Early-onset asthma	76	61.8	31 ± 17	42.5 ± 43.1	271.0 ± 402.1
Late-onset asthma	111	50.5	54 ± 16	46.5 ± 51.9	126.0 ± 406.5
Non-eosinophilic asthma	32 ^a	59.4	44 ± 17	26.4 ± 18.2	109.0 ± 260.5
Eosinophilic asthma	120 ^a	53.3	46 ± 20	49.7 ± 54.5	196.0 ± 405.4

SD, standard deviation; IQR, interquartile range.

^aBlood eosinophil counts were not available for all non-eosinophilic and eosinophilic asthma patients.

using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ by the comparative $\Delta\Delta Ct$ method (37). All procedures followed the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment (MIQE) guidelines (38).

Pharmacogenetic Study

A proof-of-concept study of the *IL5RA* expression in peripheral blood before and after 3 months of treatment with benralizumab was performed in five severe eosinophilic asthmatic patients. Benralizumab was administered at a dose of 30 mg by subcutaneous injection once every 4 weeks. Asthma control test (ACT), fractional exhaled nitric oxide (FeNO) and lung function parameters were performed before and after 3 months of treatment. Patients were considered responders in the ACT score if they achieved a score of 25 or an increase of 3 or more points after 3 months of treatment. Also, they were considered FEV1 responders if they achieved a FEV1.0 \geq 200 ml or FEV1.0 \geq 12% after 3 months of treatment. As only three doses were evaluated, exacerbations were not considered. Blood samples were collected and lung function tests were performed at each time point. All patients provided their informed consent to receive benralizumab therapy.

Statistical Analysis

Descriptive analysis was carried out using central (mean and median) and dispersion tendency (standard deviation and interquartile range) measurements, followed by bivariate and multivariate analysis. The normality distribution was assessed by Kolmogorov-Smirnov test and the homoscedasticity was also tested before applying statistical tests. Continuous variables were evaluated using either ANOVA or Kruskal-Wallis test. Statistical significance was assessed by Wilcoxon's test for changes before

TABLE 3 | The 26 protein-coding transcripts most differentially expressed ($P < 0.025$) between the group of controls and patients with allergic asthma, listed by their fold change value.

Ensemble ID	External ID gene	Fold change	P-value
Up-regulated expression			
ENSG00000161905	<i>ALOX15</i>	2.45	3.91E-05
ENSG00000091181	<i>IL5RA</i>	2.22	8.63E-08
ENSG00000103056	<i>SMPD3</i>	2.16	1.44E-07
ENSG00000105205	<i>CLC</i>	2.04	4.63E-06
ENSG00000183134	<i>PTGDR2</i>	1.99	2.64E-06
ENSG00000134489	<i>HRH4</i>	1.93	7.21E-07
ENSG00000152207	<i>CYSLTR2</i>	1.84	1.15E-09
ENSG00000171659	<i>GPR34</i>	1.83	1.27E-08
ENSG00000143297	<i>FCRL5</i>	1.75	3.18E-05
ENSG00000255587	<i>RAB44</i>	1.74	8.10E-06
ENSG00000132465	<i>JCHAIN</i>	1.70	0.007
ENSG00000276231	<i>PIK3R6</i>	1.67	9.12E-06
ENSG00000131203	<i>IDO1</i>	1.67	0.014
Down-regulated expression			
ENSG00000118113	<i>MMP8</i>	-2.75	3.17E-04
ENSG00000012223	<i>LTF</i>	-2.35	4.79E-04
ENSG00000124469	<i>CEACAM8</i>	-2.19	2.47E-03
ENSG00000123689	<i>G0S2</i>	-2.02	4.95E-03
ENSG00000118520	<i>ARG1</i>	-2.00	4.51E-05
ENSG00000168209	<i>DDIT4</i>	-1.91	4.11E-04
ENSG00000179094	<i>PER1</i>	-1.86	6.80E-04
ENSG00000096006	<i>CRISP3</i>	-1.78	0.002
ENSG00000005961	<i>ITGA2B</i>	-1.75	6.90E-04
ENSG00000179869	<i>ABCA13</i>	-1.73	0.001
ENSG00000100985	<i>MMP9</i>	-1.69	0.001
ENSG00000124102	<i>PI3</i>	-1.65	7.32E-04
ENSG00000122025	<i>FLT3</i>	-1.64	3.66E-05

and after treatment. A P -value <0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS Statistics version 21 (IBM, Armonk, NY, USA). Graphs were plotted using GraphPad Prism version 6 (San Diego, CA, USA).

RESULTS

Study Population

The phenotypic characteristics of the studied subjects of the RNAseq study and the validation analysis are shown in **Table 2**. In both assays, control individuals were older to permit a more extended period for asthma to have appeared. Thus, age was significantly higher in the control group than in patients ($P < 0.001$), except in the case of non-allergic and late-onset asthma groups, in which the disease had begun at older ages. According

to the inclusion criteria, total IgE levels were significantly higher in all patient groups than in controls ($P \leq 0.001$). Moderate persistent asthma was the most common type in both the RNAseq study and the validation analysis (43.3 and 45.7%, respectively), followed by intermittent asthma (33.3 and 26.3%, respectively). The most common aeroallergen sensitization in the validation analysis patients was pollen, followed by animal dander. No patient was receiving oral corticosteroids.

Transcriptomic RNAseq Study

Significant differences between control and asthmatic patients were observed in the transcriptomic assay ($P < 0.05$). **Table 3** shows the top 26 most differentially expressed transcripts between controls and patients with allergic asthma, according to P -value and fold change. The main biological roles of these

TABLE 4 | Gene Ontology term enrichment analysis of the more differentially expressed genes.

Term ID	Biological process	FDR	Genes
Immune system			
GO:0002376	Immune system process	1.74E-07	ABCA13, ARG1, CEACAM8, CRISP3, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, IDO1, IL5RA, LTF, MMP8, MMP9, PI3, PTGDR2, RAB44, SMPD3.
GO:0006955	Immune response	5.94E-06	ABCA13, ARG1, CEACAM8, CRISP3, CYSLTR2, IL5RA, LTF, MMP8, MMP9, PI3, PTGDR2, RAB44.
GO:0043312	Neutrophil degranulation	7.28E-05	ABCA13, ARG1, CEACAM8, CRISP3, LTF, MMP8, MMP9, RAB44.
Cellular process			
GO:0001775	Cell activation	1.32E-06	ABCA13, ARG1, CEACAM8, CRISP3, FLT3, ITGA2B, LTF, MMP8, MMP9, PIK3R6, RAB44.
GO:0019221	Cytokine-mediated signaling pathway	8.10E-03	ALOX15, FLT3, IL5RA, MMP9.
GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway	0.017	ALOX15, DDIT4, FLT3, G0S2, GPR34, IL5RA, MMP9.
GO:0007165	Signal transduction	0.012	ALOX15, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, GPR34, HRH4, IL5RA, MMP9, PIK3R6, PTGDR2.
Cellular response			
GO:0050896	Response to stimulus	2.52E-06	ABCA13, ALOX15, ARG1, CEACAM8, CRISP3, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, GPR34, HRH4, IDO1, IL5RA, ITGA2B, LTF, MMP8, MMP9, PER1, PI3, PIK3R6, PTGDR2, RAB44.
GO:0006952	Defense response	9.28E-05	ALOX15, ARG1, CRISP3, DDIT4, HRH4, IDO1, IL5RA, LTF.
GO:0006950	Response to stress	3.00E-04	ALOX15, ARG1, CRISP3, DDIT4, HRH4, IDO1, IL5RA, ITGA2B, LTF, MMP9, PIK3R6.
GO:0006954	Inflammatory response	2.50E-03	ALOX15, HRH4, IDO1, IL5RA.
GO:0071345	Cellular response to cytokine stimulus	9.30E-03	ALOX15, ARG1, FLT3, IL5RA, MMP9.
Biological regulation			
GO:0048583	Regulation of response to stimulus	6.84E-05	ALOX15, ARG1, CLC, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, HRH4, IDO1, LTF, MMP9, PER1, PIK3R6, PTGDR2.
GO:0009966	Regulation of signal transduction	6.84E-05	ALOX15, ARG1, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, HRH4, LTF, MMP9, PER1, PIK3R6, PTGDR2.
GO:0051239	Regulation of multicellular organismal process	2.30E-04	ARG1, CLC, CYSLTR2, IDO1, IL5RA, ITGA2B, LTF, MMP9, PER1, PIK3R6, PTGDR2.
GO:0001817	Regulation of cytokine production	6.20E-03	ARG1, CLC, IDO1, IL5RA, LTF, PER1.
GO:0050794	Regulation of cellular process	0.018	ALOX15, ARG1, CLC, CRY2, CYSLTR2, DDIT4, FLT3, G0S2, GPR34, HRH4, IDO1, IL5RA, ITGA2B, LTF, MMP9, PER1, PI3, PIK3R6, PTGDR2, SMPD3.

FDR, false discovery rate.

genes are described in **Table 4**, which highlights the biological processes related to the immune system. Among these genes, *IL5RA* attracted our attention as a putative asthma biomarker because it was the best positioned when considering both fold change and *P*-value data, and because of its role in different immune processes.

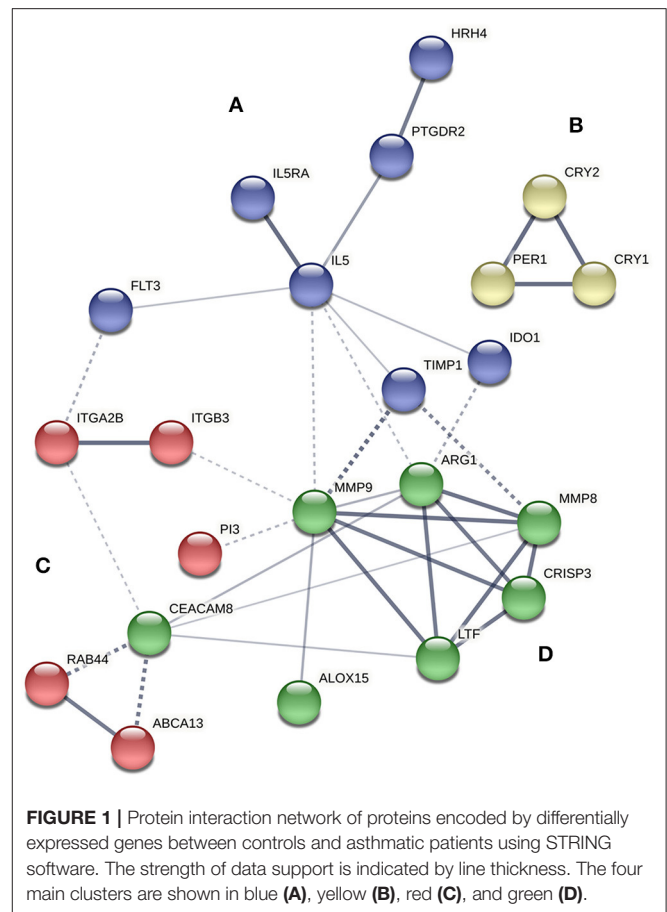
A protein-protein interaction network analysis was performed with the selected transcripts to analyze the interactions among them. Four main clusters were obtained, referred to as clusters A, B, C, and D (**Figure 1**). *IL5RA* was found in cluster A, which included seven genes: *IL5RA*, *IL5*, *FLT3* (receptor-type tyrosine-protein kinase), *PTGDR2* (prostaglandin D2 receptor 2), *HRH4* (histamine H4 receptor), *TIMP1* (metalloproteinase inhibitor 1) and *IDO1* (indoleamine 2,3-dioxygenase 1). Regarding the role of *IL5RA* in biological processes, the most significant terms were “immune system process” (FDR 1.74E-07) and “response to stimulus” (FDR 2.52E-06) (**Table 4**), as well as in Reactome pathways, such as “signaling by interleukins” and “RAF/MAP kinase cascade.”

qPCR Validation Assays

A validation qPCR analysis was performed to confirm the differences observed in the RNAseq study. Patients were classified according to the presence of atopy and nasal polyposis (NP), the severity of asthma and the age of onset of asthma. As summarized in **Table 5**, asthmatic patients had significantly higher levels of peripheral blood eosinophil counts and *IL5RA* expression than controls ($P < 0.001$). That also occurred in all subgroups except for non-eosinophilic asthma ($P = 0.707$). Interestingly, the lower increase in *IL5RA* expression levels was observed in patients with non-allergic asthma (NAA) without NP (10.3 ± 11.2 ; $P = 0.037$). Significant differences were observed when comparing these patients with the subgroup of patients who had NAA with NP ($P = 0.047$). These significant differences were not observed among the other subgroups, although *IL5RA* expression levels were significantly higher in eosinophilic asthma than in non-eosinophilic asthma ($P < 0.001$). Also, *IL5RA* expression levels were slightly higher in monosensitized patients to pollens.

In general, there was an association between asthma severity and increased levels of *IL5RA* expression (**Table 5**). Patients with intermittent asthma had the lowest expression levels of *IL5RA* (12.0 ± 13.7), while patients with severe asthma had the highest levels (19.9 ± 20.3 ; $P = 0.056$). In addition, there was a statistically significant association between asthma severity and the number of eosinophils ($P = 0.015$).

To discard a possible influence of anti-inflammatory treatments on the expression of *IL5RA*, patients receiving inhaled corticosteroids or allergen immunotherapy were compared with patients not receiving these treatments. One hundred thirty-nine patients were receiving therapy with inhaled corticosteroids; 54 patients were receiving allergen immunotherapy. No statistically significant differences in the *IL5RA* expression levels were observed between patients receiving corticosteroid treatment or allergen immunotherapy and patients not receiving these treatments.



The relationship between *IL5RA* expression levels and peripheral blood eosinophil counts was also analyzed, observing some correlation with a Pearson’s correlation coefficient of 0.520 ($P < 0.001$). Remarkably, as shown in **Figure 2A**, there were patients with the same eosinophil counts and very different expression levels of *IL5RA*. In addition, an eosinophil count-dependent increase in both *IL5RA* expression levels and dispersion was observed when the eosinophil counts were divided into quartiles (**Figure 2B**). This fact was also observed according to asthma severity. The more severe the asthma was, the greater the *IL5RA* levels were (**Figure 3**).

Pharmacogenetic Study

The clinical parameters of the patients included in the proof-of-concept study are shown in **Table 6**. Three of the patients had NP, and three were sensitized to pollens, without present clinical relevance. All patients were in treatment with high dose inhaled corticosteroids and tiotropium bromide at entry, although no patient was treated with oral corticosteroids. Before treatment with benralizumab, *IL5RA* expression levels and eosinophil counts were high in two patients, intermediate in two, and lower in another one. After 3 months of treatment, a dramatic reduction (90–100%) of peripheral eosinophil count was observed in all patients ($P = 0.042$) (**Figure 4A**). *IL5RA*

TABLE 5 | Blood eosinophil counts and *IL5RA* expression levels according to asthma diagnosis, sensitization and severity.

	N	Eosinophils/μl^a (Mean \pm SD)	<i>IL5RA</i>, relative expression (Mean \pm SD)	P-value^b	P-value^c
Controls	100	127.8 \pm 89.4	7.1 \pm 6.3		
Asthmatic patients	187	380.4 \pm 331.0	15.5 \pm 15.4	<0.001	
Non-allergic asthma (NAA)	76	373.4 \pm 367.1	13.9 \pm 13.7	<0.001	
NAA without NP	33	223.7 \pm 169.4	10.3 \pm 11.2	0.037	0.047
NAA with NP	43	510.0 \pm 441.6	16.6 \pm 14.9	<0.001	
Allergic asthma (AA)	111	385.6 \pm 303.3	16.6 \pm 16.4	<0.001	
AA without NP	82	308.4 \pm 222.9	16.5 \pm 17.0	<0.001	0.982
AA with NP	29	577.1 \pm 386.9	16.6 \pm 15.0	<0.001	
Monosensitized to pollens	22	478.7 \pm 301.6	20.2 \pm 17.3	<0.001	
Monosensitized to animal dander	6	300.0 \pm 205.2	21.4 \pm 29.2	0.050	
Monosensitized to mites	10	411.1 \pm 513.4	14.5 \pm 14.5	0.064	
Polysensitized	73	358.8 \pm 266.4	15.2 \pm 14.7	<0.001	
Intermittent asthma	49	290.8 \pm 199.3	12.0 \pm 13.7	0.003	0.056
Mild persistent asthma	29	337.4 \pm 192.7	17.7 \pm 18.4	<0.001	
Moderate persistent asthma	85	380.5 \pm 340.9	15.4 \pm 13.4	<0.001	
Severe persistent asthma	23	574.0 \pm 494.3	19.9 \pm 20.3	<0.001	
Early-onset asthma	76	364.0 \pm 307.4	14.5 \pm 14.4	<0.001	
Late-onset asthma	111	391.1 \pm 346.7	16.1 \pm 16.0	<0.001	
Non-eosinophilic asthma	32	98.5 \pm 66.1	6.6 \pm 5.8	0.707	<0.001
Eosinophilic asthma	120	455.6 \pm 332.9	18.2 \pm 15.4	<0.001	

SD, standard deviation.

^aAll P-value results for blood eosinophil counts were significant ($P < 0.05$) among each patient group vs. controls, except for non-eosinophilic asthma ($P = 0.082$).

^bP-value obtained for the comparison of *IL5RA* expression levels from each patient group vs. controls.

^cP-value obtained for comparison of *IL5RA* expression levels from NAA without NP vs. NAA with NP; AA without NP vs. AA with NP; intermittent asthma vs. severe persistent asthma; and non-eosinophilic asthma vs. eosinophilic asthma, respectively.

expression levels were reduced between 70–96% after treatment ($P = 0.043$) (**Figure 4B**). A strong correlation was found between *IL5RA* levels and peripheral blood eosinophil counts at pretreatment (**Figure 4C**) with a Pearson's correlation coefficient of 0.940 ($P = 0.017$). In addition, all patients achieved an ACT score >20 and a mean increase of 30% in FEV1, except patient 4. This patient had the highest pretreatment levels of *IL5RA* expression, and the improvement of FEV1 reached 50% (**Figure 5**).

DISCUSSION

Novel biological therapies have increased clinical treatment options for asthma. The necessity of identifying biomarkers to achieve a proper selection of these expensive compounds has led to the application of transcriptomic methods as a starting point for discovering new genes involved in the disease. In a previous transcriptomic study, increased expression of interleukin-4 receptor (IL-4R) on B cells was observed in allergic asthma patients (39). In the present study, we have focused on another type 2 cytokine, IL-5, which is also involved in asthma pathophysiology. Thus, IL-5RA has been analyzed due to its implication with eosinophilic-mediated immunity.

In the RNAseq study, significant gene expression differences were observed between the peripheral blood samples of controls and allergic asthmatic patients, with a top 26 differentially expressed genes, as shown in **Table 3**. Interestingly, most of these genes are involved in biological processes related to the immune system, suggesting their potential implication in the pathophysiology of asthma. *IL5RA* turned out to be one of the genes with the highest differential expression, which is also supported by its relevant role in asthma (16, 17) and its interactions with other immune response effector molecules that were detected in the protein-protein interaction network analysis. All proteins of the *IL5RA* cluster had already been reported to participate in functions related to inflammatory response, signal transduction and eosinophil mediated immunity, such as eosinophil chemotaxis, regulation of type 2 cytokine production or cell differentiation and proliferation (40–44). These functions are consistent with the biological processes obtained in our transcriptomic study, described in **Table 4**. Furthermore, differential *IL5RA* expression levels have also been described in the literature, both between asthmatic patients and controls (45, 46) and pre and post-benralizumab treatment samples (47).

Following the results obtained in the RNAseq study, we decided to carry out a qPCR validation study to evaluate

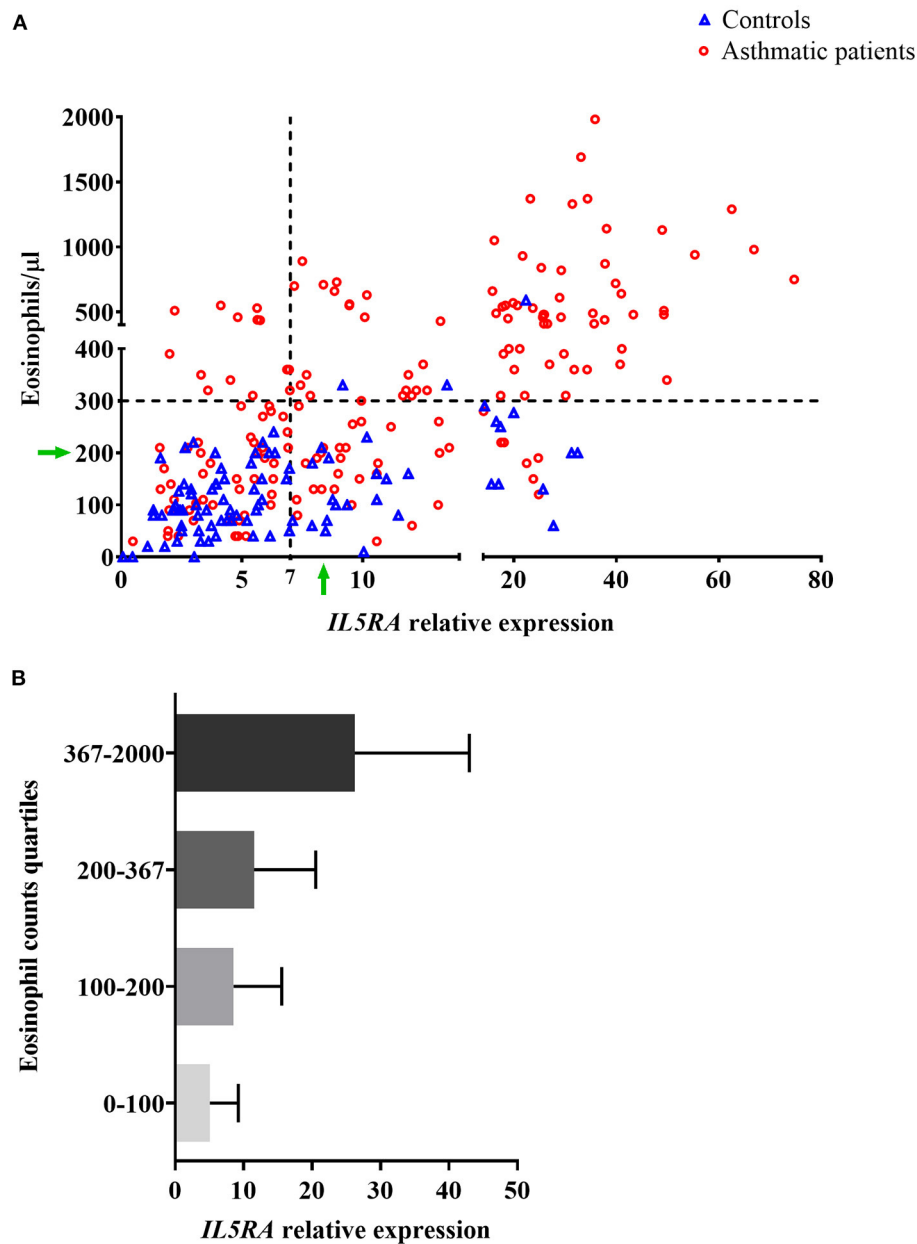


FIGURE 2 | (A) Correlation between *IL5RA* expression levels and peripheral blood eosinophil counts of controls and asthmatic patients from the validation analysis. Four quadrants were obtained by dividing according to the normality values for eosinophil counts (300/ μl) and *IL5RA* expression (7-fold). The green arrows indicate a constant value of eosinophils at which a wide range of expressed *IL5RA* values is observed, and vice versa. **(B)** *IL5RA* expression levels (mean \pm SD) in eosinophil count quartiles.

the performance of the peripheral blood *IL5RA* expression levels in the diagnosis of asthma. Levels were significantly higher in asthmatic patients than in controls, independently of the type of asthma (Table 5). This result suggests that it could be a potential marker in the diagnosis of asthma. One main limitation is its correlation with eosinophil counts, as a moderate correlation was observed ($r = 0.520$). Nevertheless, as shown by green arrows in Figure 2A, there was a notable dispersion of values, and some patients had high *IL5RA*

expression levels compared to their eosinophil counts and vice versa. Also, we found that patients with the same eosinophil counts can show very different *IL5RA* expression levels. For example, *IL5RA* expression values ranging from 4 to 32 were observed for counts of 200 eosinophils/ μl . This distribution was also found in controls, as variability in *IL5RA* expression levels was observed at low eosinophil counts. However, the dispersion was considerably more significant in patients with high eosinophil counts. This dispersion was also observed

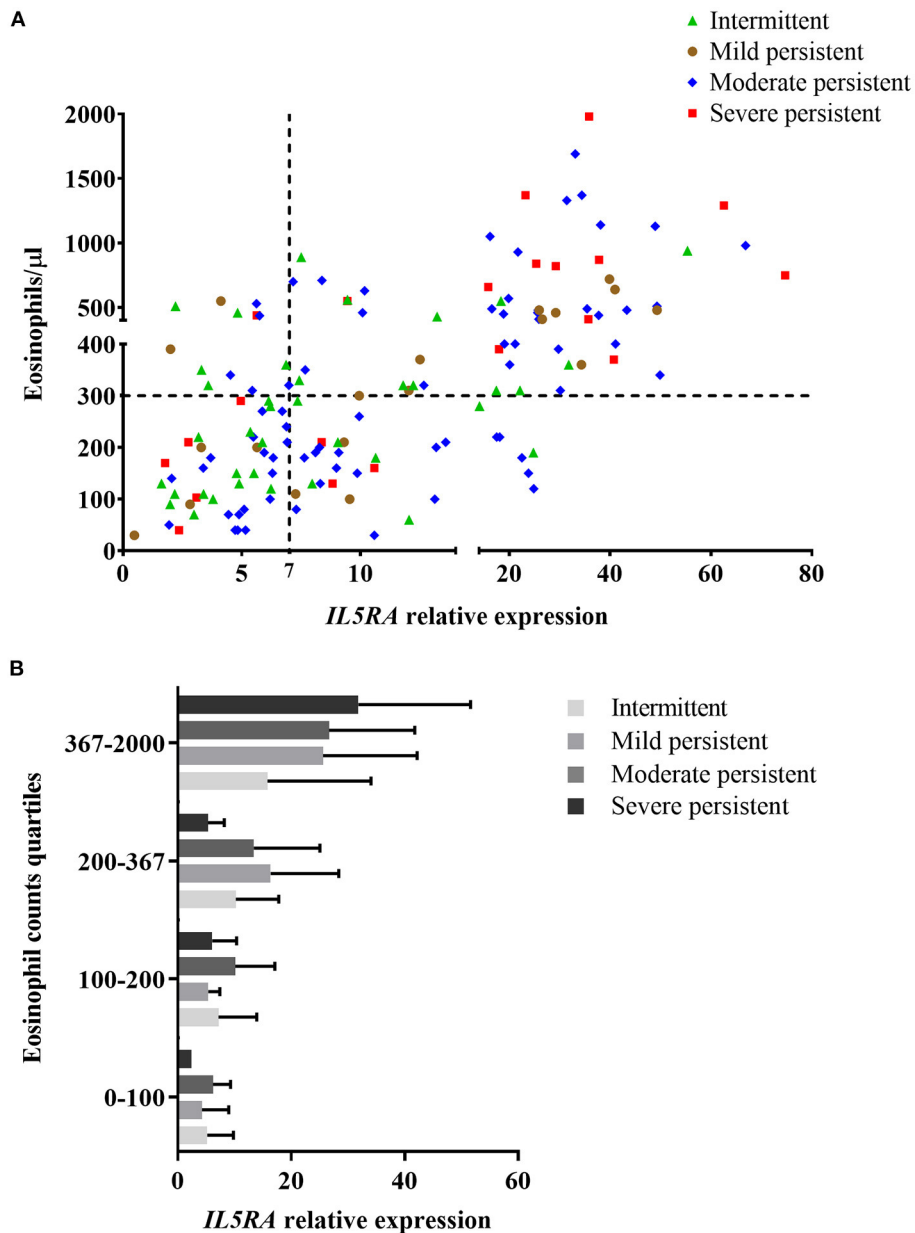


FIGURE 3 | (A) Correlation between *IL5RA* expression levels and peripheral blood eosinophil counts according to asthma severity of patients from the validation analysis. Four quadrants were obtained by dividing according to the normality values for eosinophil counts (300/ μ l) and *IL5RA* expression (7-fold). **(B)** *IL5RA* expression levels (mean \pm SD) in eosinophil count quartiles according to asthma severity.

in all subgroups according to asthma severity. It can be speculated that differences could be due to different levels of expression of the *IL5RA* by eosinophils, caused by unknown elements, such as genetic or environmental factors driving the expression of the receptor. Besides, differences could reflect the expression by other cell types, such as basophils (20). In this sense, basophils have been involved in the immunology of eosinophilic asthma (48). Furthermore, this differential expression of *IL5RA* could be related to the different responses observed to biologics directed against *IL5RA*. In fact, in the

proof-of-concept study, the patient with the highest levels of *IL5RA* expression was the best responder in terms of ACT and FEV1 (see below).

Concerning the different types of asthma, *IL5RA* expression levels were elevated in both allergic and non-allergic asthma. This finding is in agreement with the fact that responses to benralizumab are not influenced by the atopy status (49). In addition, we observed a progressive increase in the expression of *IL5RA* levels from intermittent to severe asthma, which could be related to the number of eosinophils to a great extent.

TABLE 6 | *IL5RA* expression levels and clinical parameters in pretreatment and after 3 months of benralizumab treatment.

	Eosinophils/ μ l	<i>IL5RA</i> , relative expression	FEV1, ml	FeNO, ppb	ACT
Patient 1					
Pretreatment	630	1.8	1,897	43	13
3 months	10	0.6	2,462	68	22
Patient 2					
Pretreatment	820	29.2	1,960	-	8
3 months	10	1.2	2,520	-	24
Patient 3^a					
Pretreatment	437	10.9	2,310	154	12
3 months	0	1.0	3,100	113	22
Patient 4					
Pretreatment	1,290	62.5	1,890	66	19
3 months	0	4.7	2,840	198	25
Patient 5^a					
Pretreatment	630	12.6	2,060	65	12
3 months	10	0.8	2,630	64	21

^aPatients previously treated with other biological drugs, but no improvement was observed.

One striking feature was that *IL5RA* expression levels were significantly higher in non-allergic asthma patients with NP respect to non-allergic asthma patients without NP. In this sense, it has been described that *IL5RA* expression is increased in patients with NP, particularly those with Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease (50). Whether this could be related to response to the treatment with biologics in patients with chronic rhinosinusitis with NP remains speculative.

In the proof-of-concept pharmacogenetic study, we selected peripheral blood because it is easily accessible, a crucial characteristic of an ideal biomarker (51). In addition, as we were trying to check the *IL5RA* expression as a biomarker, we selected benralizumab treatment as it is directed against *IL5RA* (21). All patients were good responders, as demonstrated by the increase of ACT and FEV1. It is known that anti-IL-5 and anti-IL-5RA treatments do not significantly modify FeNO levels (52), as it happened in most of our patients. The increase observed in some of them could be due to acute exposure to allergens (53) because adherence to inhaled corticosteroids seemed to be appropriated. Due to the short follow-up period, exacerbations were not considered, although no patient had an exacerbation after treatment with benralizumab; even more, they almost did not require rescue bronchodilators. All patients showed a dramatic decrease in peripheral blood eosinophil counts with values between 0 and 10 eosinophils/ μ l, as observed in the phase III studies (21). The pretreatment levels of *IL5RA* were highly variable in patients, ranging from 1.8 to 62.5, and were strongly correlated with pretreatment peripheral blood eosinophil counts ($r = 0.940$). Thus, we believe that *IL5RA* expression level could add value to peripheral blood eosinophil counts. Accordingly, the patient with the highest *IL5RA* expression levels showed the best lung function response and reached an ACT of 25. In a very recent study, Nakajima et al. (54) described a group of super

responder to benralizumab patients that had higher expression of genes related to eosinophils in peripheral blood, together with significant reductions in the expressions of genes associated with eosinophilic inflammatory responses after treatment with benralizumab, with *IL5RA* among them. So, the expression of *IL5RA* could be a useful biomarker of response, as it seems to be more discriminant than eosinophil counts.

This study is not without limitations since it is a unicentric study, and the number of patients is low. Nevertheless, this fact gives uniformity to the study. Additionally, we have mainly focused on *IL5RA*, and other genes may also be relevant in response to treatment. Nevertheless, we selected *IL5RA* by its crucial implication in the immunology of T2-asthma and because benralizumab is directed against this molecule. Finally, the proof-of-concept study has a limited number of patients and a short period of follow-up.

CONCLUSION

There is an urgent need for biomarkers of response to biologics in asthma. In this study, we have explored the peripheral blood *IL5RA* expression levels as a possible useful biomarker for several reasons. First, *IL5RA* is a plausible etiopathogenic target and a biologic target for the treatment of asthma. Second, peripheral blood is easily accessible. Third, its expression is easily measurable and reproducible. Fourth, it varies in different types of asthma. And, finally, although it has a moderate correlation with eosinophils, *IL5RA* expression levels probably do not reflect the same, as these levels vary for a particular count of peripheral blood eosinophils. Further studies are required for confirming the findings of the present study.

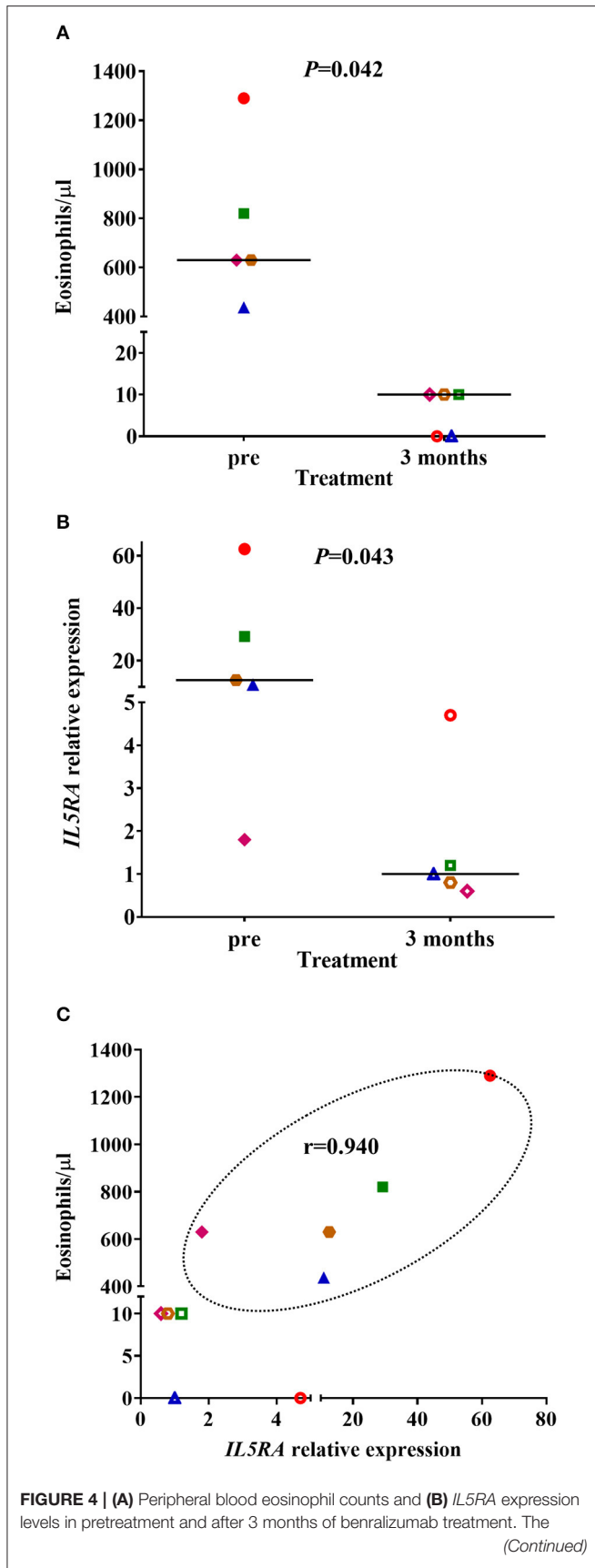
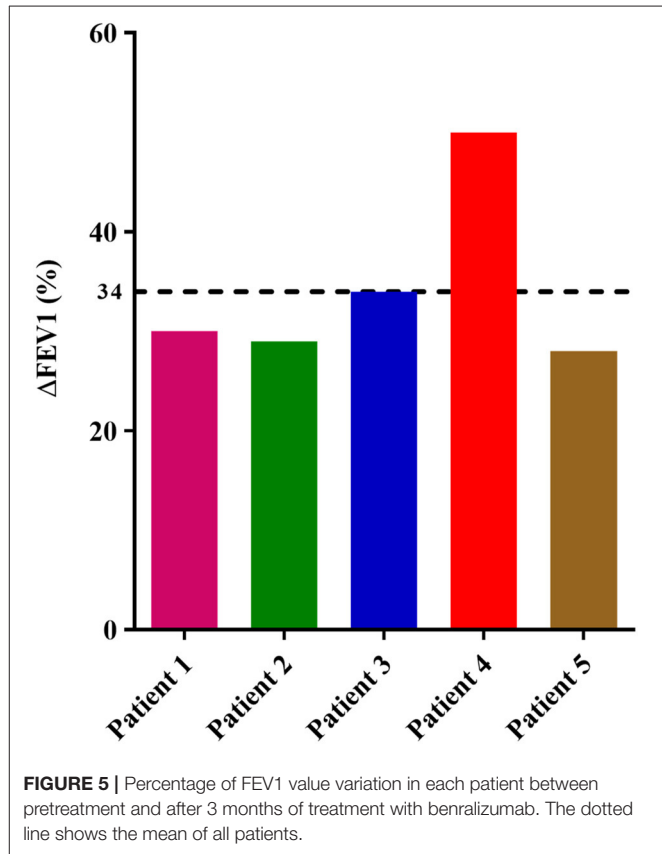


FIGURE 4 | median of each group is also shown. **(C)** Correlation between *IL5RA* expression levels and peripheral blood eosinophil counts at pretreatment and after 3 months of benralizumab treatment. Pearson's correlation coefficient in the pretreatment is also shown. Each symbol represents a patient (◆ Patient 1; ■ Patient 2; ▲ Patient 3; ● Patient 4; ● Patient 5). The filled symbols correspond to the pretreatment and the empty symbols to after 3 months of benralizumab treatment.



DATA AVAILABILITY STATEMENT

The required data is now publicly accessible in the NCBI repository with the code PRJNA686899.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by The Clinical Research Ethics Committee of the Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL) (PI 2020-02-433). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SE-P, DH-J, AG-S, ME, MM, JR-G, JT, MI-G, CS, and ID have contributed in designing research studies, conducting experiments, acquiring data, analyzing data, and writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III and the European Regional Development Fund (Grant Nos. PI17/00818 and PI20/00268), by a grant of the Junta

de Castilla y León and the European Regional Development Fund (IES161P20) and by a grant of the Instituto de Salud Carlos III to the Red temática de investigación en salud Asma, Reacciones Adversas y Alérgicas (ARADYAL) RD16/0006/0019.

REFERENCES

- Vos T, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abate KH, Abd-Allah F, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet*. (2017) 390:1211–59. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2
- Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. (2020). Available online at: <https://www.ginasthma.org/> (accessed April 25, 2020).
- Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* (2012) 18:716–25. doi: 10.1038/nm.2678
- Levine SJ, Wenzel SE. Narrative review: The role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes. *Ann. Intern. Med.* (2010) 152:232–7. doi: 10.7326/0003-4819-152-4-201002160-00008
- Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* (2015) 16:45–56. doi: 10.1038/ni.3049
- Caminati M, Le Pham D, Bagnasco D, Canonica GW. Type 2 immunity in asthma. *World Allergy Organ. J.* (2018) 11:13. doi: 10.1186/s40413-018-0192-5
- GEMA 4.4. *Guía española para el manejo del asma*. (2020). Available online at: <https://www.gemasma.com/> (accessed May 1, 2020).
- Kaur R, Chupp G. Phenotypes and endotypes of adult asthma: moving toward precision medicine. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2019) 144:1–12. doi: 10.1016/j.jaci.2019.05.031
- Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2010) 181:315–23. doi: 10.1164/rccm.200906-0896OC
- Haldar P, Pavord ID, Shaw DE, Berry MA, Thomas M, Brightling CE, et al. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2008) 178:218–24. doi: 10.1164/rccm.200711-1754OC
- Coumou H, Bel EH. Improving the diagnosis of eosinophilic asthma. *Expert Rev. Respir. Med.* (2016) 10:1093–103. doi: 10.1080/17476348.2017.1236688
- Buhl R, Humbert M, Bjermer L, Chanez P, Heaney LG, Pavord I, et al. Severe eosinophilic asthma: a roadmap to consensus. *Eur. Respir. J.* (2017) 49:1700634. doi: 10.1183/13993003.00634-2017
- Fitzpatrick AM, Moore WC. Severe asthma phenotypes—how should they guide evaluation and treatment? *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* (2017) 5:901–8. doi: 10.1016/j.jaip.2017.05.015
- Isidoro-García M, Sánchez-Martín A, García-Sánchez A, Sanz C, García-Berrolcal B, Dávila I. Pharmacogenetics and the treatment of asthma. *Pharmacogenomics*. (2017) 18:1271–80. doi: 10.2217/pgs-2017-0024
- Canonica GW, Ferrando M, Baiardini I, Puggioni F, Racca F, Passalacqua G, et al. Asthma: personalized and precision medicine. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* (2018) 18:51–8. doi: 10.1097/ACI.0000000000000416
- Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int. Immunol.* (2009) 21:1303–9. doi: 10.1093/intimm/dxp102
- Brussino L, Heffler E, Bucca C, Nicola S, Rolla G. Eosinophils target therapy for severe asthma: critical points. *Biomed. Res. Int.* (2018) 2018:7582057. doi: 10.1155/2018/7582057
- Tavernier J, Devos R, Cornelis S, Tuypens T, Van der Heyden J, Fiers W, et al. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific α chain and a β chain shared with the receptor for GM-CSF. *Cell*. (1991) 66:1175–84. doi: 10.1016/0092-8674(91)90040-6
- Kupczyk M, Kuna P. Benralizumab: an anti-IL-5 receptor α monoclonal antibody in the treatment of asthma. *Immunotherapy*. (2018) 10:349–59. doi: 10.2217/imt-2017-0161
- Kolbeck R, Kozhich A, Koike M, Peng L, Andersson CK, Damschroder MM, et al. MEDI-563, a humanized anti-IL-5 receptor α mAb with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity function. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2010) 125:1344–53. doi: 10.1016/j.jaci.2010.04.004
- Dávila González I, Moreno Benítez F, Quirce S. Benralizumab: a new approach for the treatment of severe eosinophilic asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* (2019) 29:84–93. doi: 10.18176/jiacci.0385
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (1995) 152:77–121.
- Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur. Respir. J.* (2014) 43:343–73. doi: 10.1183/09031936.00202013
- Sanz C, Isidoro-García M, Dávila I, Moreno E, Laffond E, Ávila C, et al. Promoter genetic variants of prostanoid DP receptor (PTGDR) gene in patients with asthma. *Allergy*. (2006) 61:543–8. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01025.x
- Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. *Allergy*. (1989) 44 Suppl 10:1–59.
- Sendin-Hernández MP, Ávila-Zarza C, Sanz C, García-Sánchez A, Marcos-Vadillo E, Muñoz-Bellido FJ, et al. Cluster analysis identifies 3 phenotypes within allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* (2018) 6:955–61. doi: 10.1016/j.jaip.2017.10.006
- Babraham Bioinformatics. *FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. (2020). Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed August 17, 2020).
- Kim D, Perlea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* (2013) 14:R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36
- Picard Tools. By Broad Institute (2020). Available online at: <http://broadinstitute.github.io/picard/> (accessed August 28, 2020).
- Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. (2013) *arXiv[Preprint]*. arXiv:1303.3997.
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van Baren MJ, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* (2010) 28:511–5. doi: 10.1038/nbt.1621
- Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. (2015) 31:166–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* (2014) 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- STRING. *Functional Protein Association Networks*. (2020). Available online at: <https://string-db.org/> (accessed October 13, 2020).
- Primer3.0. (2018). Available online at: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (accessed March 6, 2018).
- Beacon Designer (2020). Available online at: <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1> (accessed March 6, 2018).
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. (2001) 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* (2009) 55:611–22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797

39. Pascual M, Roa S, García-Sánchez A, Sanz C, Hernandez-Hernandez L, Grealley JM, et al. Genome-wide expression profiling of B lymphocytes reveals IL4R increase in allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2014) 134:972–5. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.015
40. Agrawal DK, Hopfenspirger MT, Chavez J, Talmadge JE. Flt3 ligand: a novel cytokine prevents allergic asthma in a mouse model. *Int. Immunopharmacol.* (2001) 1:2081–9. doi: 10.1016/S1567-5769(01)00122-9
41. Domingo C, Palomares O, Sandham DA, Erpenbeck VJ, Altman P. The prostaglandin D2 receptor 2 pathway in asthma: a key player in airway inflammation 11 medical and health sciences 1107 immunology 11 medical and health sciences 1102 Cardiorespiratory Medicine and Haematology. *Respir. Res.* (2018) 19:189. doi: 10.1186/s12931-018-0893-x
42. Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br. J. Pharmacol.* (2004) 142:161–71. doi: 10.1038/sj.bjp.0705729
43. Hassan N, Mohamed-Hussein A, Mohamed E, Mohamed O, Mohamed H, Tammam M. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) as non-invasive biomarkers of remodelling in asthma. *Eur. Respir. J.* (2015) 46(Suppl. 59):OA1467. doi: 10.1183/13993003.congress-2015.OA1467
44. Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, et al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* (2004) 114:270–9. doi: 10.1172/JC121275
45. Bigler J, Boedigheimer M, Schofield JPR, Skipp PJ, Corfield J, Rowe A, et al. A severe asthma disease signature from gene expression profiling of peripheral blood from U-BIOPRED cohorts. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2017) 195:1311–20. doi: 10.1164/rccm.201604-0866OC
46. Virkud Y V., Kelly RS, Croteau-Chonka DC, Celedón JC, Dahlin A, Avila L, et al. Novel eosinophilic gene expression networks associated with IgE in two distinct asthma populations. *Clin. Exp. Allergy.* (2018) 48:1654–64. doi: 10.1111/cea.13249
47. Sridhar S, Liu H, Pham TH, Damera G, Newbold P. Modulation of blood inflammatory markers by benralizumab in patients with eosinophilic airway diseases. *Respir. Res.* (2019) 20:14. doi: 10.1186/s12931-018-0968-8
48. Suzuki Y, Wakahara K, Nishio T, Ito S, Hasegawa Y. Airway basophils are increased and activated in eosinophilic asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* (2017) 72:1532–9. doi: 10.1111/all.13197
49. Chipps BE, Newbold P, Hirsch I, Trudo F, Goldman M. Benralizumab efficacy by atopy status and serum immunoglobulin E for patients with severe, uncontrolled asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* (2018) 120:504–11. doi: 10.1016/j.anai.2018.01.030
50. Buchheit KM, Dwyer DF, Ordovas-Montanes J, Katz HR, Lewis E, Vukovic M, et al. IL-5R α marks nasal polyp IgG4- and IgE-expressing cells in aspirin-exacerbated respiratory disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2020) 145:1574–84. doi: 10.1016/j.jaci.2020.02.035
51. Medrek SK, Parulekar AD, Hanania NA. Predictive biomarkers for asthma therapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* (2017) 17:69. doi: 10.1007/s11882-017-0739-5
52. Hoyte FCL, Gross LM, Katial RK. Exhaled nitric oxide: an update. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* (2018) 38:573–85. doi: 10.1016/j.iac.2018.06.001
53. Sordillo JE, Webb T, Kwan D, Kamel J, Hoffman E, Milton DK, et al. Allergen exposure modifies the relation of sensitization to fraction of exhaled nitric oxide levels in children at risk for allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2011) 127:1165–72.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2011.01.066
54. Nakajima M, Matsuyama M, Arai N, Yamada H, Hyodo K, Nonaka M, et al. Identification of whole blood gene expressions correlated with responsiveness to benralizumab. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2020) S0091-6749:31110–6. doi: 10.1016/j.jaci.2020.08.004

Conflict of Interest: ID declares having received honoraria for participation in speakers' bureaus or advisory boards from Astra-Zeneca, GSK, and Sanofi.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Elena-Pérez, Heredero-Jung, García-Sánchez, Estravís, Martín, Ramos-González, Triviño, Isidoro-García, Sanz and Dávila. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



#272

Estudio de expresión de *IL5Rα* y *CRTH2* en sangre periférica de un paciente tratado secuencialmente con omalizumab, mepolizumab y benralizumab

Asunción García Sánchez^{1,2,5}, Clara Sanabria Luis², Sandra Elena Pérez³, David Hansoe Heredero Jung³, Catalina Sanz^{1,4,6}, Ignacio Dávila^{1,2,5,6}

1. IBSAL, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, Salamanca, España
2. Departamento de Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.
3. Servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica. Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.
4. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca, Salamanca, España
5. Servicio de Inmunoalergia. Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.
6. Red cooperativa de investigación en salud de Asma, Reacciones Adversas y Alérgicas (ARADyAL) del Instituto de Salud Carlos III.

INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad compleja con múltiples fenotipos que reflejan mecanismos moleculares y celulares distintos. El asma eosinofílica es el fenotipo más frecuente del asma grave, caracterizado por la producción y liberación de citocinas de tipo 2 por los linfocitos Th2 e ILC2. No existen parámetros adecuados para seleccionar biológicos en el asma T2, particularmente biomarcadores, habiéndose empleado la eosinofilia en sangre periférica (SP) y el FeNO como biomarcadores predictivos de respuesta. Se presenta un paciente tratado secuencialmente con omalizumab, mepolizumab y benralizumab al que se le determinó la expresión de *IL5Rα* y *CRTH2* en SP.

MÉTODOS

Varón de 53 años diagnosticado de asma persistente moderada por hipersensibilidad al polen de gramíneas hace más de 20 años, que evolucionó a un asma grave eosinofílica con poliposis nasosinusal. Recibió tratamiento con omalizumab entre 2012 y 2017, mepolizumab en 2018 y benralizumab desde 2019. Se aisló ARN total de modo seriado a partir de SP. Se determinó la expresión de ARNm de *IL5Rα* y *CRTH2* mediante qPCR utilizando SYBR Green. Se utilizó el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ empleando *GAPDH* como gen de referencia.

RESULTADOS

La respuesta al omalizumab y mepolizumab fue incompleta, con discreta reducción de las exacerbaciones, sin mejoría de la función pulmonar ni de la calidad de vida. Con benralizumab no ha vuelto a presentar exacerbaciones y el FEV1 ha mejorado 610 ml (24,5%), alcanzando un ACT de 25 (Tabla 1).

Con el omalizumab no se observó reducción de los eosinófilos, ni mejoría de FEV1. La reducción fue parcial con mepolizumab y muy intensa con benralizumab, con una reducción significativa de los niveles de *CRTH2* e *IL5Rα* ($p < 0,001$) (Figura 1) (Tabla 1). Además, se encontraron correlaciones positivas entre los niveles de expresión de los biomarcadores y el recuento de eosinófilos en sangre periférica (Tabla 2).

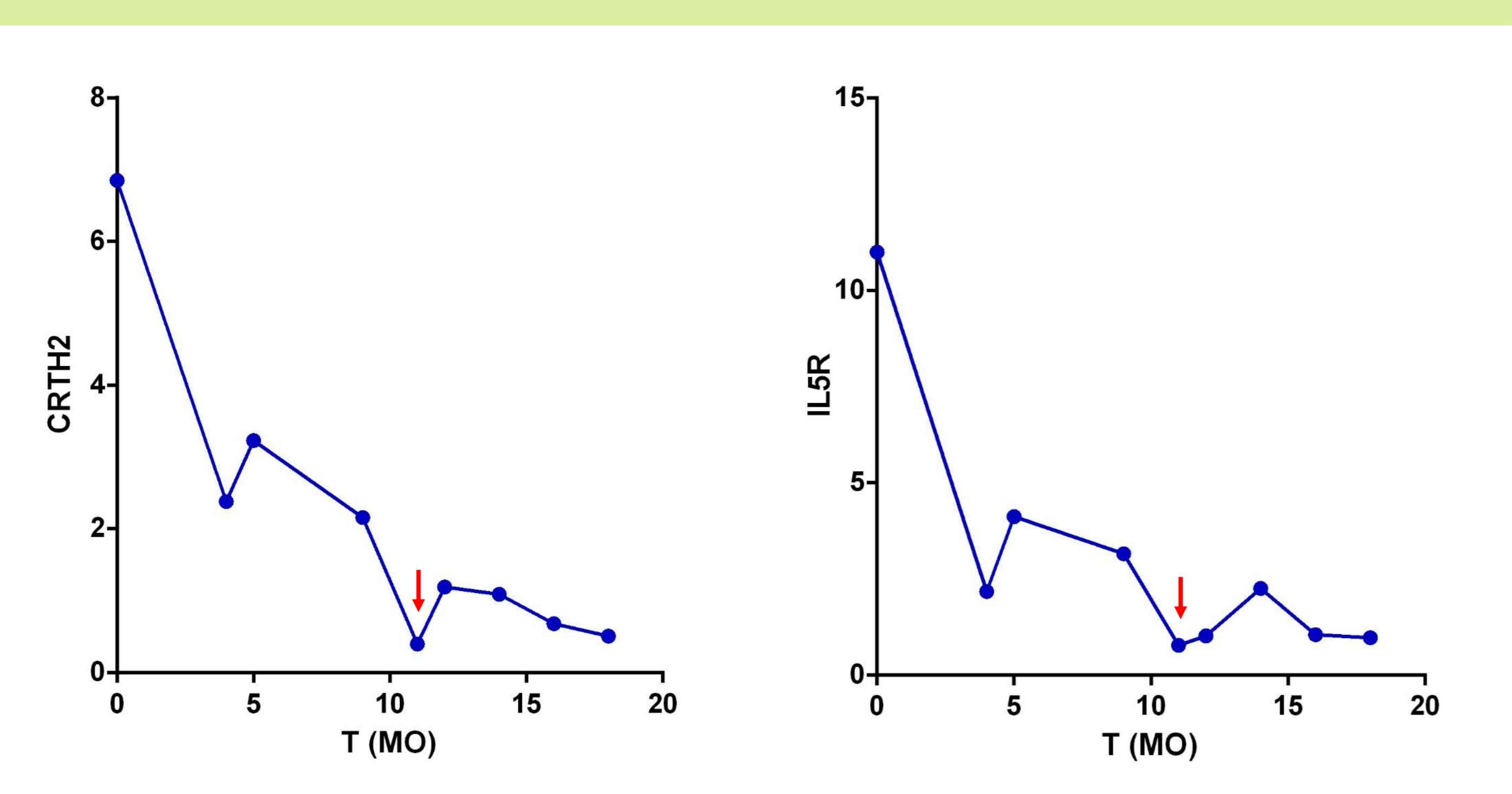


Figura 1. Análisis de expresión de *CRTH2* e *IL5Rα* tras las dosis recibidas de los tratamientos biológicos. Se indica con una flecha roja la 2ª dosis de Benralizumab en la que observamos una mayor reducción en la expresión de los biomarcadores.

Tabla 1. Parámetros clínicos y expresión de biomarcadores.

Tto	EO	Linfocitos	FEV1	FeNO	IgE	<i>CRTH2</i>	<i>IL5Rα</i>
Pre-Oma	437	2400	2820	154	233	6,85	10,99
Oma*	790	2980	1310	n/d	194	n/d	n/d
2ª dosis Mepo	60	2090	1720	162	110	2,38	2,17
4ª dosis Mepo	60	1840	1890	n/d	101	3,23	4,12
Pre-Benra	90	3370	2310	162	100	2,16	3,15
2ª dosis Benra	0	1910	2670	168	91,4	0,40	0,77
3ª dosis Benra	0	2060	3100	113	111	1,19	1,02
4ª dosis Benra	0	2190	3060	n/d	138	1,09	2,25
5ª dosis Benra	10	2020	2910	104	144	0,68	1,06
6ª dosis Benra	10	1720	2810	n/d	172	0,51	0,97

Tto, tratamiento; *4 años y 9 meses tras tratamiento con Omalizumab; EO, eosinófilos; FEV1, volumen espirado forzado en 1 segundo; FeNO, Fracción de óxido nítrico exhalado; n/d, no disponible.

Tabla 2. Correlaciones de Pearson

	<i>CRTH2</i>	P valor	<i>IL5Rα</i>	P valor
Eosinófilos	0,949	<0,001	0,974	<0,001

CONCLUSIÓN

Los niveles de ARNm de *IL5Rα* y *CRTH2* disminuyeron de modo distinto con los diferentes tratamientos y se correlacionaron con la eosinofilia periférica. Podrían actuar como biomarcadores, aunque son necesarios estudios adicionales.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Salud Carlos III (PI20/00268), cofinanciado con fondos FEDER; a los fondos de investigación SEAIC 2019; Consejería de Educación-Plan operativo de Empleo Juvenil de Castilla y León; RETIC ARADyAL RD16/0006/0019).

IL-5 Receptor Subunit Alpha Expression As A Possible Biomarker In Asthma

Sandra Elena-Pérez¹, David Hansoe Heredero-Jung¹, Asunción García-Sánchez^{2,3,4}, Miguel Estravís^{2,3,4}, María J. Martín^{2,4}, Francisco Muñoz-Bellido^{2,3,5}, María Isidoro-García^{1,2,4,6}, Catalina Sanz^{2,4,7}, Ignacio Dávila^{2,3,4,5}

¹Department of Clinical Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Spain; ²Institute for Biomedical Research of Salamanca, Spain; ³Department of Biomedical Sciences and Diagnostics, University of Salamanca, Spain; ⁴Network for Cooperative Research in Health - RETICS ARADyAL, Carlos III Health Institute, Spain; ⁵Department of Allergy, University Hospital of Salamanca, Spain; ⁶Department of Medicine, University of Salamanca, Spain; ⁷Department of Microbiology and Genetics, University of Salamanca, Spain.

BACKGROUND

- Asthma is a heterogeneous syndrome with a broad clinical spectrum and high drug response variability [1].
- There is a lack of biomarkers in asthma. Based on asthma immunopathogenesis, precision medicine can be a promising strategy for identifying biomarkers [2].
- IL-5 promotes proliferation, differentiation and activation of eosinophils by binding to the IL-5 receptor, located on the surface of eosinophils. Biologic therapies acting on the IL-5/IL-5 receptor axis have been developed [3,4].
- We have previously described significantly higher *IL5RA* levels in asthmatic patients than controls [5].

OBJECTIVE

This study aimed to investigate the expression of *IL5RA* in patients with several types of asthma and its role as a possible biomarker.

METHODS

- 90 nonatopic nonasthmatic controls and 152 atopic and nonatopic asthmatic patients with different asthma severity, with or without nasal polyposis (NP), were included.
- The expression of *IL5RA* in peripheral blood was determined using qPCR. Eosinophil counts were also determined.
- Patients were distributed in four quadrants (Q1-Q4) according to the normality values for eosinophil counts (300/ μ l) and *IL5RA* gene expression (7-fold, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method) [5].

RESULTS

Table 1. Distribution of controls and patients with several types of asthma in four quadrants. Data are shown in percentages.

	Q1	Q2	Q3	Q4	P-value
Controls (N=90)	66.7	30.0	0.0	3.3	
Asthmatic patients (N=152)	28.3	21.7	8.6	41.4	<0.001
Intermittent asthma (N=38)	39.5	18.4	13.2	28.9	
Mild persistent asthma (N=19)	21.1	21.1	10.5	47.4	
Moderate persistent asthma (N=73)	26.0	26.0	6.8	41.1	
Severe persistent asthma (N=21)	23.8	14.3	4.8	57.1	0.192*
Asthma with NP (N=59)	20.3	10.2	10.2	59.3	
Asthma without NP (N=93)	33.3	29.0	7.5	30.1	0.001
Atopic asthma (N=87)	24.1	21.8	8.0	46.0	
Nonatopic asthma (N=65)	33.8	21.5	9.2	35.4	0.533

* P-value obtained for comparison of intermittent asthma vs. severe persistent asthma.

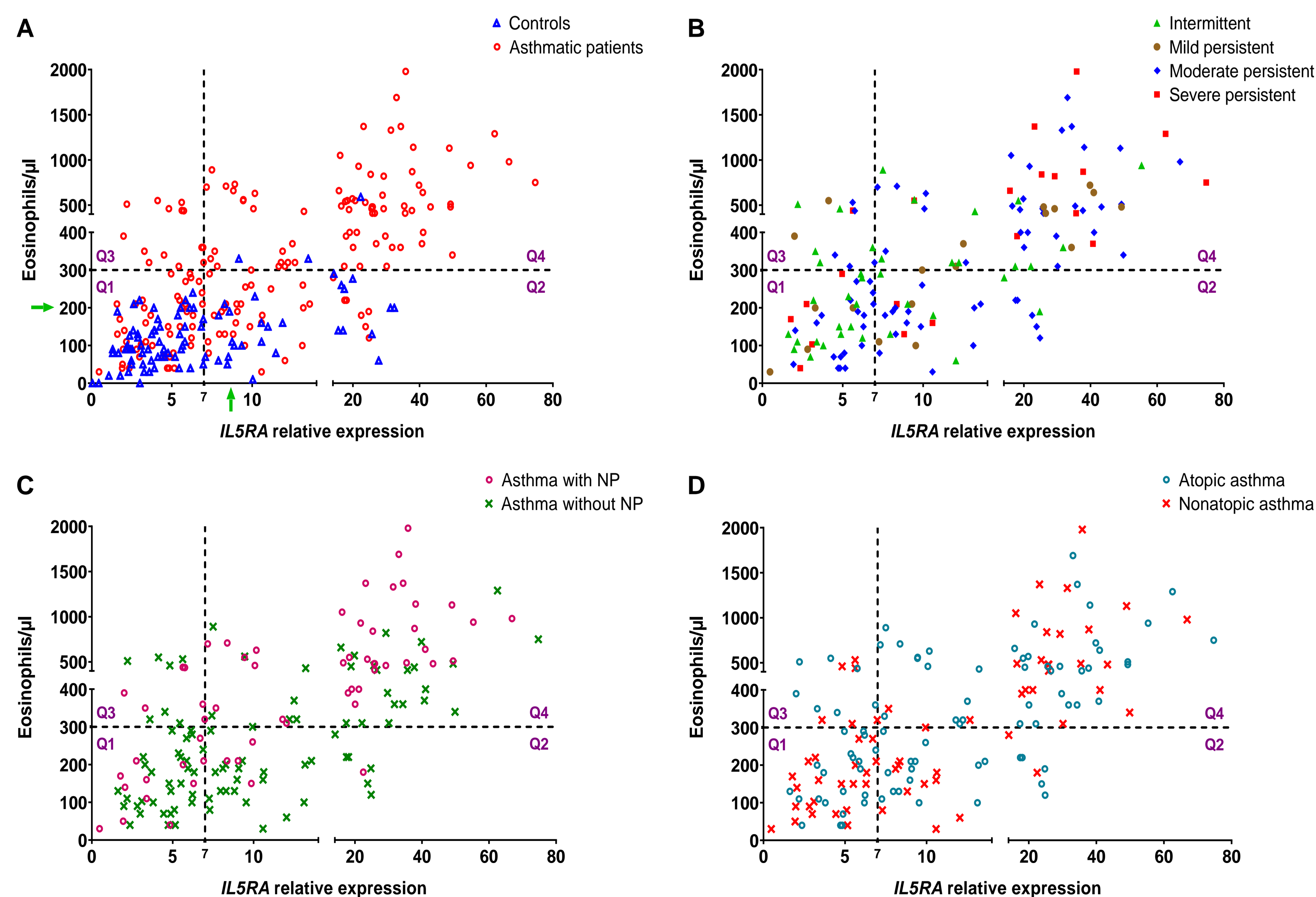


Figure 1. Correlation between *IL5RA* expression levels and peripheral blood eosinophil counts of controls and asthmatic patients (1A), severity of asthma (1B), asthma with and without NP (1C) and atopic and nonatopic asthma (1D). The green arrows indicate a constant value of eosinophils at which a wide range of expressed *IL5RA* values is observed, and vice versa.

Presented at the 2021 Virtual Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI). February 26-March 1, 2021.

- All controls except three had normal eosinophil levels, although there were two populations, one with normal *IL5RA* levels (Q1) and another with high expression levels (Q2) (Figure 1A).
- Asthmatic patients showed higher dispersion of *IL5RA* levels (Table 1). Although there was some correlation between eosinophils and *IL5RA* levels, there were patients with normal eosinophils and high *IL5RA* levels and vice versa (Figure 1A).
- The more severe the asthma was, the greater the *IL5RA* levels were (Table 1 and Figure 1B).
- There were differences in the distribution of asthmatic patients with and without NP (Table 1 and Figure 1C).
- No differences were found between atopic and nonatopic asthma (Table 1 and Figure 1D).

CONCLUSIONS

- The determination of *IL5RA* levels provides additional information to eosinophil levels to classify asthmatic patients. It might also provide information relative to prognosis and response to therapy.
- Although further studies are required, *IL5RA* expression levels might play a role as a biomarker and pharmacogenetic factor in asthma.

REFERENCES

- Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med.* 2012;18(5):716–25.
- Isidoro-García M, Sánchez-Martín A, García-Sánchez A, Sanz C, García-Berrocal B, Dávila I. Pharmacogenetics and the treatment of asthma. *Pharmacogenomics.* 2017;18(13):1271–80.
- Kouro T, Takatsu K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: From discovery to therapy. *Int Immunol.* 2009;21(12):1303–9.
- Kupczyk M, Kuna P. Benralizumab: An anti-IL-5 receptor α monoclonal antibody in the treatment of asthma. *Immunotherapy.* 2018;10(5):349–59.
- Elena-Pérez S, Heredero-Jung DH, García-Sánchez A, Estravís M, Martín MJ, Ramos-González J, et al. Molecular analysis of IL-5 receptor subunit alpha as a possible pharmacogenetic biomarker in asthma. *Front Med.* 2020. doi: 10.3389/fmed.2020.624576.

L33 Safety review of Year 1 Oral Immunotherapy Clinic: Multifood Immunotherapy in Real-World setting



Antonella Cianferoni, MD PhD FAAAAI¹, Elizabeth Hanna², Megan Lewis, MSN CRNP¹, Maria Katerina Alfaro¹, Kristen Corrigan³, Jill Buonanno, RN⁴, Rahul Datta, MD PhD¹, Terri Brown-Whitehorn, MD¹, Jonathan Spergel, MD, PhD⁵; ¹Children, ²Children's Hospital of Philadelphia, ³The Children, ⁴The Children's Hospital of Philadelphia, ⁵Children Hospital of Philadelphia.

RATIONALE: Clinical trials demonstrated efficacy multifood immunotherapy (MF-OIT). We sought to examine safety of MF-OIT in a real-world setting.

METHODS: From September 2019 to August 2020 patients from the allergy practice at the Children's Hospital of Philadelphia with history of IgE-mediated food allergy reactions were offered to start oral immunotherapy (OIT) to up to 5 foods (milk, egg, peanut, wheat, soy, almond, walnut/pecan, cashew/pistachio, sesame, hazelnut) if skin prick test wheal diameter was greater than 3 mm and/or specific serum immunoglobulin E levels were greater than 0.35 kU/L. Each food was introduced separately and up dosed over 22 weeks. Target maintenance dose was 300 mg peanut, tree nuts or sesame protein and 4g for milk, soy, egg and wheat.

RESULTS: Two-hundred and five patients started OIT for one (SF-OIT) or multiple (MF-OIT): 37% reached maintenance (18 MF-OIT, 57 SF-OIT), 55% are still up dosing for one or more foods (31 MF-OIT, 82 SF-OIT) due to COVID-19 delays, 8% discontinued. Patients had similar discontinuation rate among MF-OIT (6.2%) vs those on SF-OIT (8.6%). Reason for OIT discontinuation were gastrointestinal symptoms (2.4%-1MF-OIT and 4 SF-OIT), Eosinophilic Esophagitis (0.5%-1 MF-OIT), anaphylaxis at office up dosing (0.5%-1 SF-OIT), anxiety (0.5%-1 SF-OIT), compliance (1.4%-3 SF-OIT) or unrelated pathologies (1.4%-3 SF-OIT). One patient on MF-OIT received epinephrine on maintenance dose at home after exercising immediately after dosing and has continued OIT without further issues

CONCLUSIONS: We describe that in a pediatric population both MF-OIT and SF-OIT appear to be generally safe and well tolerated, even if anaphylaxis can occur.

L34 Oleoylethylamide Induces Eosinophilic Airway Inflammation in Bronchial Asthma



Eun Kyung Kwon¹, Ga Young Ban¹; ¹Kangdong Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine.

RATIONALE: Endocannabinoids are known to have immunomodulatory biologic effects, however, the contribution of oleoylethanolamide (OEA) on airway inflammation remains to be elucidated. In this study, OEA increased the population of T2 cytokines releasing ILC2s in mice. In addition, we revealed its impact on activating peripheral eosinophils from asthmatics. Therefore, we propose that OEA may contribute to the pathogenesis of eosinophilic inflammation of asthma.

METHODS: To confirm the effects of oleoylethanolamide (OEA), the expression of proinflammatory cytokines was measured by RT-qPCR and ELISA in A549 cells. BALB/c mice with 4 days of OEA treatment were assessed for number of airway inflammatory cells and cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid, airway hyperresponsiveness, and type 2 innate lymphoid cells. Furthermore, the eosinophil activation after the treatment of OEA was evaluated with cellular CD69 of eosinophils from human whole blood using a flow cytometry.

RESULTS: We observed that OEA induced the inflammatory response *in vitro* as well as *in vivo*. OEA increased the levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8, IL-33 in A549 cells. In addition, it induced eosinophilic inflammation, IL-4, IL-5, IL-13 and IL-33 in bronchoalveolar lavage fluid and airway hyperresponsiveness. OEA increased the numbers of IL-5 or IL-13-producing ILC2s in mouse model. Finally, we confirmed that OEA increased the level of CD69 expression, one of important marker

of activation for eosinophils, on purified eosinophils from patients with asthma than those from healthy controls.

CONCLUSIONS: OEA may play a role in the pathogenesis of asthma through activation of ILC2 cells and eosinophils.

L35 IL-5 Receptor Subunit Alpha Expression As A Possible Biomarker In Asthma



Sandra Elena Pérez¹, David Heredero Jung¹, Asunción García Sánchez², Miguel Estravís², María Martín³, Francisco Muñoz Bellido¹, María Isidoro García¹, Catalina Sanz³, Ignacio Dávila¹; ¹University Hospital of Salamanca, ²University of Salamanca, ³Institute for Biomedical Research of Salamanca.

RATIONALE: There is a lack of biomarkers in asthma. We have previously described significantly higher *IL5RA* levels in asthmatic patients than controls. This study aimed to investigate the expression of *IL5RA* in patients with several types of asthma and its role as a possible biomarker.

METHODS: One hundred nonatopic nonasthmatic controls and 187 atopic and nonatopic asthmatic patients with different asthma severity, with or without nasal polyposis, were included. The expression of *IL5RA* in peripheral blood was determined using qPCR. Eosinophil counts were also determined. Patients were distributed in four quadrants according to *IL5RA* gene expression and eosinophils counts (normal or elevated).

RESULTS: All controls except three had normal eosinophil levels, although there were two populations, one with normal *IL5RA* levels and another with high expression levels. Asthmatic patients showed a higher dispersion of *IL5RA* levels. Although there was some correlation between eosinophils and *IL5RA* levels, there were patients with normal eosinophils and high *IL5RA* levels and vice versa. The more severe asthma was, the greater the *IL5RA* levels were. There were also differences in the distribution of asthmatic patients with and without nasal polyposis. No differences were found between atopic and nonatopic asthma.

CONCLUSIONS: The determination of *IL5RA* levels provides additional information to eosinophil levels to classify asthmatic patients. It might also provide information relative to prognosis and response to therapy. Although further studies are required, *IL5RA* could play a role as a biomarker and pharmacogenetic factor in asthma.



Co-expression of *IL5RA* and *PTGDR2* in patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. Synergy of two biomarkers.

Herederó-Jung D. H.¹, Elena-Pérez S.¹, García-Sánchez A.^{2, 3, 4}, Estravís M.^{3, 4}, Martín M.J.^{3, 4, 5}, Muñoz-Bellido F.^{3, 6}, Isidoro-García M.^{1, 3}, Sanz C.^{3, 4, 7}, Dávila I.^{2, 3, 4, 6}

1. Dept. of Clinical Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; 2. Dept. of Biomedical and Diagnostic Sciences, University of Salamanca, Salamanca, Spain; 3. Institute for Biomedical Research of Salamanca, Salamanca, Spain; 4. Asthma, allergic and adverse reactions (ARADYAL) network for cooperative research in health of Instituto de Salud Carlos III; 5. Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, Salamanca, Spain; 6. Dept. of Immunology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; 7. Dept. of Microbiology and Genetics, University of Salamanca, Salamanca, Spain.

Background and aim

Chronic Rhinosinusitis (CRS) has a significant impact on quality of life, loss of productivity, and public healthcare costs. CRS is often associated with nasal polyps (CRSwNP), affecting 1 to 4.5% of the adult population and 0.1% of children. The search for reliable biomarkers, which could be used both as therapeutic targets and for patient monitoring, is an unmet need. This study aimed to investigate the role of *IL5RA* and *PTGDR2* separately or combined as possible biomarkers in CRSwNP.

Methods

Seventy-seven non-atopic controls without CRS or asthma, 92 atopic and non-atopic patients with CRSwNP, and 19 non-atopic asthmatic patients without CRS, were included in the study. The expression of *IL5RA* and *PTGDR2* in peripheral blood was determined by qPCR, as well as the eosinophil count. Correlation and contrast studies were performed, and results were categorized in four quadrants (Q1 to 4), according to the levels of *IL5RA* and *PTGDR2* expression (below or above the mean expressions in controls).

Results

Pearson correlation (r) between *IL5RA* and *PTGDR2* was 0.6 ($p < 0.001$). The correlation was significant in all groups of patients. There was a clear difference in the distribution of controls and patients between Q1 (low expression of both genes) and Q4 (high expression) (42% vs. 19% for controls and 17% vs. 59% for patients, respectively). Most patients with CRSwNP w/o asthma had high levels of *IL5RA* but not high levels of *PTGDR2*. High expression levels of both genes were similarly distributed in asthmatic patients. In the contrast tests, *IL5RA* levels were significantly higher in CRSwNP without asthma, while *PTGDR2* levels were not. However, *PTGDR2* was significantly higher in CRSwNP with asthma, compared to CRSwNP without asthma. A positive

correlation of the expression of both genes with eosinophil counts was significant in all groups, except for CRSwNP without asthma, but the correlation between the expression of *IL5RA* and *PTGDR2* was maintained.

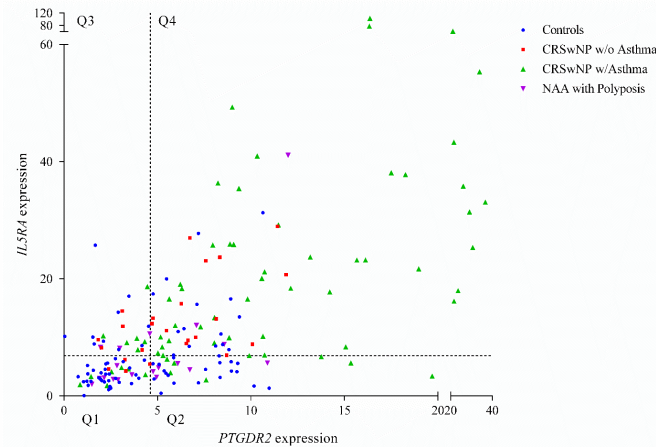


Figure 1. Scatterplot of *IL5RA* and *PTGDR2* expressions. Calculations were made by the comparative $\Delta\Delta Ct$ method. All procedures followed the MIQE guidelines. Q1: quadrant 1 ($PTGDR2 \leq 4.62$; $IL5RA \leq 6.85$); Q2: quadrant 2 ($PTGDR2 > 4.62$; $IL5RA \leq 6.85$); Q3: quadrant 3 ($PTGDR2 \leq 4.62$; $IL5RA > 6.85$); Q4: quadrant 4 ($PTGDR2 > 4.62$; $IL5RA > 6.85$). CRSwNP: chronic rhinosinusitis with nasal polyps; NAA: non-allergic asthma.

The performance of both biomarkers was studied via ROC curves, establishing the optimal cut-off values using the Youden's J statistic. For *IL5RA*, the cut-off was the same as the mean expression in controls (6.85; SE=0.71, SP=0.68). As for *PTGDR2*, it was higher than the mean expression (9.6; SE=0.32, SP=0.96). However, the Youden index was a bit lower but similar for a cut-off value of

4.31 (SE=0.75, SP=0.53), which could be more interesting in regards of maximizing the sensitivity, and approaches more to the mean expression in controls. A new predicted probability variable was rendered using a binary logistic regression model, using both biomarkers. Interaction between them was also considered, but discarded due to loss of significance.

Conclusions

The expression of *IL5RA* and *PTGDR2* could play a role as biomarkers in CRSwNP. Although both are co-expressed and correlated with eosinophils, different combinations of the three variables could help in classifying the patients. The different expression patterns between CRSwNP with or without associated asthma and the independence from eosinophils in CRSwNP without asthma could be interesting for these biomarkers. Further studies are required.

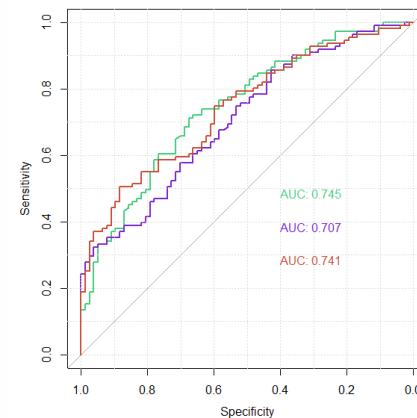


Figure 2. Representation of ROC curves for *IL5RA* (green), *PTGDR2* (purple) and the combination of both (red). Highest AUC corresponds to *IL5RA* (0.745±0.037). The use of both biomarkers does not improve the AUC, given the regression model (0.741±0.035).

Table*

	LS mean (SE) change from baseline at Week 52		Adjusted mean difference (95% CI, mepolizumab vs placebo) at Week 52	p-value
	Placebo	Mepolizumab		
Work time missed due to health (%)	2.9 (1.46)	-0.3 (1.40)	-3.18 (-7.16, 0.81)	0.118
Impairment while working due to health (%)	-25.2 (2.06)	-28.4 (2.00)	-3.21 (-8.86, 2.43)	0.264
Overall work impairment due to health (%)	-21.9 (2.35)	-27.7 (2.29)	-5.80 (-12.25, 0.64)	0.078
Activity impairment due to health (%)	-25.3 (1.77)	-33.1 (1.74)	-7.80 (-12.67, -2.93)	0.002

*The mixed-model repeated measures analysis was performed with covariates of treatment group, geographic region, baseline score, log(e) baseline blood eosinophil count, visit plus interaction terms for visit by baseline and visit by treatment group. The worst possible score was assigned if patients had nasal surgery before Week 52 or withdrew prior to Week 52 or had missing data at Week 52 for any other reason. CI, confidence interval; LS, least squares; SE, standard error; SF-36, 36-item Short Form Survey; WPAI, Work Productivity and Activity Impairment

1111 | Co-expression of IL5RA and PTGDR2 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Synergy of two biomarkers.

Heredero-Jung D. H.¹, Elena-Pérez S.¹, García-Sánchez A.², Estravís M.³, Martín M.J.^{2,3}, Muñoz-Bellido F.¹, Isidoro-García M.¹, Sanz C.³, Dávila I.¹

1. University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; 2. University of Salamanca, Salamanca, Spain; 3. Institute for Biomedical Research of Salamanca, Salamanca, Spain

Background: Chronic Rhinosinusitis (CRS) has a significant impact on quality of life, loss of productivity, and public healthcare costs. CRS is often associated with nasal polyps (CRSwNP), affecting 1 to 4.5% of the adult population and 0.1% of children. The search for reliable biomarkers, which could be used both as therapeutic targets and for patient monitoring, is an unmet need. This study aimed to investigate the role of *IL5RA* and *PTGDR2* separately or combined as possible biomarkers in CRSwNP.

Method: Seventy-seven non-atopic controls without CRS or asthma, 92 atopic and non-atopic patients with CRSwNP, and 19 non-atopic

Conclusion: The expression of *IL5RA* and *PTGDR2* could play a role as biomarkers in CRSwNP. Although both are co-expressed and correlated with eosinophils, different combinations of the three variables could help in classifying the patients. The different expression patterns between CRSwNP with or without associated asthma and the independence from eosinophils in CRSwNP without asthma could be interesting as a biomarker point of view. Further studies are required.

asthmatic patients without CRS, were included in the study. The expression of *IL5RA* and *PTGDR2* in peripheral blood was determined by qPCR, as well as the eosinophil count. Correlation and contrast studies were performed, and results were categorized in four quadrants (Q1 to 4), according to the levels of *IL5RA* and *PTGDR2* expression (below or above the mean expressions in controls).

Results: Pearson correlation (*r*) between *IL5RA* and *PTGDR2* was 0.6 ($p < 0.001$). The correlation was significant in all groups of patients. There was a clear difference in the distribution of controls and patients between Q1 (low expression of both genes) and Q4 (high expression) (42% vs. 19% for controls and 17% vs. 59% for patients, respectively). More patients with CRSwNP without asthma had high levels of *IL5RA* only than of *PTGDR2* only. High levels of both were similarly distributed in asthmatic patients. In the contrast tests, *IL5RA* levels were significantly higher in CRSwNP without asthma, while *PTGDR2* levels were not. However, *PTGDR2* was significantly higher in CRSwNP with asthma, compared to CRSwNP without asthma. A positive correlation of both genes with eosinophil counts was significant in all groups, except for CRSwNP without asthma, but the correlation between the expression of *IL5RA* and *PTGDR2* was maintained.

Q1 (*PTGDR2* ≤ 4.62; *IL5RA* ≤ 6.85)

	n	n (%)	Sex [†]	Age, y	EO	IL5RA	PTGDR2
Controls	32	41.56	65.63	59.16 ± 17.35	96.03 ± 66.92	3.37 ± 1.55	2.28 ± 0.91
Patients	19	17.12	57.89	54.53 ± 16.66	298.41 ± 352.73	3.77 ± 1.24	2.73 ± 0.95
CRSwNP	12	13.04	41.67	57.33 ± 19.1	396.36 ± 405.05	4.1 ± 1.29	2.85 ± 1.07
CRSwNP w/o A	5	20	0	64 ± 14.98	528 ± 501.22	4.99 ± 0.8	3.24 ± 0.85
CRSwNP w/A	7	10.45	71.43	52.57 ± 21.34	286.67 ± 308.85	3.46 ± 1.21	2.58 ± 1.19
NAA w/o CRSwNP	7	36.84	85.71	49.71 ± 10.1	118.83 ± 100.98	3.19 ± 0.99	2.5 ± 0.71